P. 3966

HALIOTIS

VOL. 33
2003 (2004)

issn 0397.765 x

SOCIETE FRANÇAISE DE MALACOLOGIE

Haliotis, revue de la Société Française de Malacologie, est ouverte à des articles originaux couvrant tous les aspects de l'étude des Mollusques. Son rythme de parution est en principe annuel.

La soumission d'un manuscrit à *Haliotis* sous-entend qu'il n'est pas publié ou sous presse ailleurs. Les auteurs qui désireront utiliser ultérieurement des matériaux publiés dans *Haliotis* devront préalablement obtenir la permission de la S.F.M.

Soumission des manuscrits

Les textes doivent être saisis sous un traitement de texte d'usage courant. Il sera soumis dans un premier temps deux exemplaires tirés sur format A4 avec double interligne, ainsi que deux copies des illustrations. Les manuscrits sont à adresser au secrétariat général de la S.F.M., 55 rue Buffon, 75005 Paris, ou à un des membres du comité de rédaction.

Le manuscrit sera lu par un ou plusieurs spécialistes choisi(s) par le comité de rédaction, dont les commentaires seront adressés à l'auteur (sous forme anonyme ou non au choix du rapporteur). L'auteur a l'obligation de prendre en considération les commentaires du rapporteur et adressera s'il y a lieu une version révisée. Le comité de rédaction prendra alors, au vu des commentaires du rapporteur, une décision d'acceptation ou de refus du manuscrit.

Organisation du texte

- titre concis et informatif: pensez qu'il doit servir à l'indexation. Si le titre contient un nom de genre ou d'espèce peu connu, ce nom sera accompagné du nom d'un taxon supraspécifique
- prénoms (en entier) et noms des auteurs
- adresses des auteurs.
- "abstract" en Anglais, précédé du titre en Anglais.
- résumé en Français (éventuellement, titre en Français si l'article est rédigé dans une autre langue) exposant les principaux résultats, mais pas de descriptions de taxa nouveaux éventuellement introduits dans l'article.; éventuellement, résumé dans une autre langue si approprié.
- texte proprement dit comprenant, dans cet ordre, Introduction, Matériel et méthodes, Résultats, Discussion, Conclusions, Remerciements, Bibliographie.

Les niveaux hiérarchiques de sous-titres seront limités le plus possible. Les sous-titres ne seront en aucun cas numérotés.

Illustrations

Seules les illustrations en noir et blanc seront prises en charge par la revue. Le surcoût des illustrations en couleur sera à la charge des auteurs. Les illustrations, à leur taille définitive, mesurent au maximum 16,5 x 23 cm.

Les illustrations soumises après acceptation des manuscrits doivent être de bonne qualité, prêtes à clicher, ou des fichers électroniques au format TIFF, 600 ppp (noir et blanc) ou 300 ppp (demi-teintes). Pour les graphiques, des tirages d'imprimante laser ou à jet d'encre sur papier sont acceptables comme originaux, mais il est préférable d'adresser une copie électronique, au format TIFF ou dans le format natif du logiciel qui a produit le graphique si celui-ci est d'usage courant (Excel, Corel Draw...) *En aucun cas, les illustrations préalablement insérées dans un traitement de texte (Word ou autre) ne pourront être reproduites par l'imprimeur (ces logiciels altèrent les fichiers d'images insérées).*

Toutes les figures doivent être numérotées en une série unique, qu'il s'agisse de dessins, de photographies montées en planche, de cartes ou de graphiques. Les cartes devront faire figurer des coordonnées géographiques et avoir un cadre. Les tableaux (comportant exclusivement du texte ou des chiffres, à l'exclusion de graphiques) seront numérotés en une autre série. Les légendes des figures et des tableaux seront regroupées sur une feuille à part, et copiées également dans la disquette. Les auteurs pourront indiquer dans le texte la position souhaitée des figures et tableaux.

(suite sur la 3e page de couverture)

Ce volume est dédié
à la mémoire de Pierre LUBET
(1925-2003)
Professeur émérite à l'Université de Caen
Membre fondateur de la Société Française de Malacologie

Bibliothèque Centrale Muséum
3 3001 00258664 9

In vitro synthesis of organic matrix in primary culture cells from the outer mantle epithelium of *Anodonta cygnea* (Unionidae)

Joana MONTEIRO[1], Isaura RIBEIRO[1], Isabel SOARES da SILVA[1], Luis BALDAIA[1,2] and Jorge MACHADO[1,2]

RÉSUMÉ

Synthèse *in vitro* de la matrice organique dans des cultures primaires de cellules de l'épithélium externe du manteau d'*Anodonta cygnea* (Unionidae)

Des lignées cellulaires primaires de l'épithelium externe du manteau d'*Anodonta cygnea* ont pu être isolées par un traitement enzymatique avec hialuronidase (1,4 mg/ml) et mises en culture *in vitro* à la température ambiante. La culture était maintenue comme il est habituel pour des cultures *in vitro* des cellules ostéoblastes dans des conditions stériles. En conséquence, les paramètres essentiels de culture soit l'atmosphère (CO_2 5%), le pH (7,2) et la composition du milieu (DMEM) ont été ajustés de façon à établir des conditions optimales pour l'adhérence des cellules OME ainsi que leur croissance et maintenance. Le milieu DMEM était complementé, en alternance, soit avec sérum de cheval soit avec du fluide extrapalléal, soit un mélange des deux. D'une façon générale, une bonne adhérence cellulaire était observée après une incubation de deux heures. Au bout d'une période de cinq à huit jours une haute densité de cellules – cellules sécrétrices – était identifiée au milieu d'un faisceau épais de polymères organiques transparents quel que soit le milieu utilisé. Dans cette matrice, des taux significativement plus élevés de glycosaminoglicanes (GAGs) (129,5 ± 20 µl/ml) et de acide uronique (82,5 ± 3,8 µl/ml) étaient observés en utilisant le milieu complementé avec le mélange, tandis que les hexosamines (118,4 ± 10 µl/ml), la chitine (30,1 ± 0,0 µl/ml) et les protéines (21,5 ± 0,9 µl/ml) étaient présentes dans le milieu contenant le serum de cheval en quantités plus élevées que celles observées dans le milieu contenant le fluide extrapalléal. Ces résultats suggèrent que les lignées de cellules primaires d'*Anodonta cygnea* mantiennent une capacité de sécretion élevée dans les cultures *in vitro* avec le milieu DMEM, surtout quand il est

[1] ICBAS- Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto, Lg. Prof. Abel Salazar, 24099-003, Porto-Portugal. Corresponding author: Jorge Machado <jmachado@icbas.up.pt>

[2] CIIMAR- Centro Interdisciplinar de Investigação Marítima e Ambiental, 4099-003 Porto, Portugal

BIBL. DU MUSÉUM PARIS

complementé par le sérum de cheval ou par un mélange de celui-ci et du fluide extrapalléal. Ce comportement est intrinsèque à leur activité normale dans les processus de formation de la coquille.

ABSTRACT

Primary cells from the outer mantle epithelium (OME) of *Anodonta cygnea* were successfully isolated by enzymatic treatment with hyaluronidase (1.4 mg/ml) and subsequently cultured *in vitro* at room temperature. The culture was made in the same way as those generic ones described for an *in vitro* culture of osteoblast cells under sterilised conditions. Thus, such basic culture parameters, as atmosphere (CO_2 5%), pH (7.2) and medium composition (DMEM) were adjusted to provide the optimal conditions for OME cell adhesion and subsequent growth and maintenance. DMEM medium was also alternatively supplemented with horse serum, extrapallial fluid or a mixture of both as additives. In general, after a two-hour period of incubation a good cell adhesion was observed. Within five to eight days a high density of cells –secretory cells- was identified inside a dense array of transparent organic polymers in the three different media. In this matrix a significantly highest content of glycosaminoglicans (GAGs) (129.5 ± 20 μg/ml) and uronic acid (82.5 ± 3.8 μg/ml) was detected in the mixture medium, while the hexosamines (118.4 ± 10 μg/ml), chitin (30.1 ± 0.0 μg/ml) and proteins (21.5 ± 0.9 μg/ml) were detected in horse serum medium against the lowest values observed in the extrapallial medium. The present results suggest that primary cells from OME of *Anodonta cygnea* maintain a high secretory ability inside the *in vitro* culture medium (DMEM), mainly with horse serum or a mixture of this with extrapallial fluid. This behaviour is intrinsic to its normal activity related to the shell formation process.

INTRODUCTION

The outer mantle epithelium (OME) in freshwater clams is closely appressed to the shell and provides a selective barrier to the transport of ions towards the extrapallial fluid, which is in contact with the mineralised surface of the shell (Istin and Kirschner, 1968; Neff, 1972). A mechanism of ionic transport through the external epithelium associated with the calcification processes was also described in *Anodonta cygnea* by Coimbra *et al.* (1988) and Machado *et al.* (1990) and in *Unio complanata* by Hudson (1992). Furthermore, transitory calcium deposits formed inside the mollusc, mainly in the mantle and the gills were seen to play an active role in the shell formation (Abolins-Krogis, 1961; Wilbur, 1964; Durming, 1957; Guardabassi and Piacenza, 1958; Tsujii, 1960; Machado *et al.*, 1988b).

According to studies of Wilbur (1964), the outer epithelium cells also secrete the organic matrix where the calcium carbonate mineral is captured forming aragonite/calcite crystals on the inner shell surface of the molluscs. The organic matrix contains mainly chitin and proteoglycans as a complex of sulfated macromolecules composed of linear chains of glycosaminoglycan (GAG) covalently attached to a core protein (Crenshaw, 1972; Weiner and Hood, 1975; Wheeler *et al.*, 1981; 1988; Wilbur and Manyak, 1984; Machado *et al.*, 1991; Poncet *et al.*, 2000). A crucial role of the soluble matrix fraction for the calcium carbonate nucleation, the calcium transport from the extrapallial fluid to the shell and thereby for the regulation of the crystal growth in the shell was suggested in several studies (Grégoire, 1972; Misogianes and Chasteen, 1979; Greenfield *et al.*, 1984; Wheeler and Sikes, 1984).

The *in vitro* study of biomineralisation mechanism is usually a technique well controlled using osteoblasts from the vertebrate bone as culture cells (Schoeters *et al.* 1992; Modrowski and Marie 1993; Mukai *et al.* 1993; Davis 1994). However, the manipulation of osteoblasts was

demonstrated to be more delicate and expensive. The well-stratified and individualised epithelial structure of OME in *Anodonta cygnea* may represents an interesting alternative tissue, which shares some of the most important mechanisms of biomineralisation with osteoblasts. A new model for studying of molluscan extracellular matrix were successfully enhanced by Poncet *et al.*, (2000) using mantle cell primary cultures from the gastropod *Haliotis tuberculata*. This allowed us to predict that the molluscan bivalve can be an efficient model for studying the general concepts related to calcification phenomena.

Thus, in this work the aim was to isolate cells from the extrapallial epithelium of *Anodonta cygnea* and to maintain cell viability under *in vitro* conditions by the establishment of a set of parameters and methodologies in order to promote cell growth, proliferation and secretion of the matrix. Proteins, GAGs and chitin were the main components to be measured in this organic matrix.

MATERIAL AND METHODS

Adult specimens of *Anodonta cygnea* were collected from their natural habitat in the Mira Lagoon, in the North of Portugal. The animals were kept in tanks of freshwater at room temperature, in an aerobic atmosphere and a periodic supply of microalgae.

Based on the methodology used for the osteoblast culture, alterations in some parameters such as the differences in growth and proliferation of cells from the mantle of *A. cygnea* were performed. In fact, the osmolality in the artificial solutions was adjusted to about 50 mOsm in order to mimic the physiological conditions (Coimbra *et al.*, 1988). Furthermore, the tissue manipulation and cell growth were carried out at room temperature.

The disruption of the adductor muscles and the isolation of the outer epithelium started the isolation procedure of epithelial cells from the mantle. Due to the presence of a large amount of mucus the epithelium was subject to two washing periods with the isosmotic solution in an aerobic atmosphere containing 95% of O_2 and 5% of CO_2. After tissue fragmentation, different concentrations of hyaluronidase enzyme (product nº H-2251, Sigma) and different incubation periods were also assayed in order to maximise the mucolytic enzymatic action and simultaneously the disruption of intercellular bonds. Afterwards, the cells were submitted to a mechanical treatment by consecutive pippetings for ten minutes. The large fragments of the epithelial tissue in suspension were removed by gauze filtration. The cell suspension was centrifuged (1000 rpm, 0ºC, 15 minutes), and the pellet was washed twice with the isosmotic solution. The centrifugation conditions caused minimal cell damage and allowed the maintenance of the cell metabolic activity.

Immediately after dissociation, cells were counted with Neubauer chamber and cell viability was estimated by the dye exclusion test in a 0.2% trypan blue (nº T-6146, Sigma). Cells were observed through unfixed preparations using light microscopy. For the same purpose, staining by Hemacolor (Merck) and the cytospin method for optic microscopy (Russel-Pinto *et al.*, 1994) with Wright stain (Pipes *et al.*, 1997) were used. Then, the isolated cells were resuspended in one millilitre of culture medium (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM, nº D-6421, Sigma) and incubated in culture plates (15 × 60 mm plates, nº TL100, Randox Laboratories, Ltd.) in sterile conditions.

One simple culture system was built with a plastic chamber allowing a slight flux of a sterilised and humidified atmosphere (95% of O_2 and 5% of CO_2). This system prevented pH variations and was kept at a room temperature of 23 ± 3°C. Assays were performed using three different media conditions: horse serum (n° H-1270, Sigma), extrapallial fluid from *A. cygnea*, and a mixture of both supplements in the same proportion. For each of the three media conditions there was a control without cells for the respective supplements. A single solution was added in all plates consisting of a mixture of antibacterial compounds Rifampicin (n° R-7382, Sigma) and Carbanicilin (n° C-3416, Sigma), and antifungi compounds Gentamicin (n° G-1397) and Anfotericin B (n° A-2411, Sigma). Each of these antibiotics was added in a final concentration of 100 µg/l. Fresh medium was substituted every 24 hours per plate. Four-six well culture assays per experimental situation were done in different plastic chambers. Cells were plated at 10^4 cells per well culture plates.

A glucosaminoglican (GAG) measurement (Whiteman, 1973) in the matrix samples with a mass of 70 mg from all plates was performed after six days. This test is based on the formation of insoluble complexes with GAGs and the quantification is by spectrophotometry according the Gold (1979). This procedure allows us to measure the dosage of GAGs.

The determination of total protein concentration was based on the method described by Lowry *et al.* (1951), which has been used by several workers to determine the protein content in mollusc biological preparations (Fisher and Mewell 1986; Swift and Ahmed 1983).

Hexosamine analyses were made on lyophilised matrix pellets after individual hydrolysis of samples. The technical procedure of the hydrolysis in 6N HCl and the subsequent hexosamine measurement by ion-exchange chromatography on a ninhydrin-based detection automatic system (LKB 4151 Alpha Plus® Amino acid Analyser) were made according to the works of Moura *et al.* (2000a and 2000b).

Chitin values were determined based on the amount of hexosamines present in solution after acidic hydrolysis (Brine and Austin, 1981; Marsh and Sass, 1984) corrected for deacetylation, after discounting the respective GAG related fraction, assuming an hyaluronic acid-like composition (Moura *et al.*, 2000b).

For statistical analyses, the average of 4-5 samples per measured parameter, as GAGs, hexosamines, uronic acids and total proteins were treated by the t-student test in total. Significant differences in dependent samples were considered when $p < 0.05$.

RESULTS

After dissociation, the percentage of viable cells (based on the trypan blue exclusion-staining test) were determined with Neubauer chamber under light microscope. These observations showed that the number of viable culture cells, isolated from the OME of *Anodonta cygnea*, was around 50%. The dissociation assay was successfully performed with incubation of thirty minutes, at room temperature, in the isosmotic solution with hyaluronidase at a final concentration of 1.4 mg/ml. It constituted the optimal conditions in order to keep cell viability with minimum damage.

The individualised cells from the OME were observed at different phases: immediately after isolation presenting rectangular shape as that in the original epithelium; from 15-30 min with a round shape due to the superficial tension on the cellular membrane (Figures 1 and 2). The round phase cells presented two distinct regions with different areas: one consisting of a smooth surface plasma membrane and another consisting of a dense array of filaments (microvilli) in the external face of the plasma membrane (Figures 2a and 2b). Hemacolor staining resulted in the visualisation of the purple stained nucleus in several cells (Figure 3).

The culture cells maintained the adhesion capacity after two hours of living in different media conditions as those described. After five days some cell secretion occurred in every plate producing on its surface a dense matrix under yellow-brown pellicles (Figure 4a and 4b). Some bigger dark spots resulting from cellular aggregates were observed up to eight days (Figure 4a and 4b). After careful washing and the addition of fresh media, these clusters kept their adhesion ability on the plate bottom. An important function of this washing step was the removal of cell fragments and wastes.

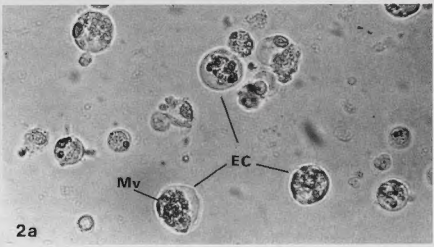
During the 5-8 day period the dense matrix secreted over the cells was considered as a cellular product (Figure 4), since it was observed in the cell culture plates but not in the control plates. In the plates where horse serum was added the number of clusters was great, indicating the group with higher secretory activity of the cells. All these light observations were compared to the control situation (without cells) where the dark yellow matrix formations and cellular aggregates were never found.

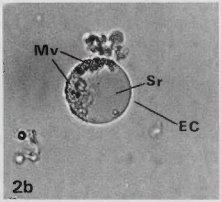
GAGs, uronic acids, hexosamines, and protein measurements indicated the presence of these components in all cell culture plates (Figure 5). All these parameters in the extrapallial fluid medium (group II) occurred significantly at lower concentrations than in the other assays, with the exception of chitin, which was lower in the mixture medium (group III). The highest concentration of GAGs is observed in the situation where the cells were cultured with the mixture medium (group III), with 129.5 ± 20 μg/ml on average. In both other assays, with horse serum (group I) and extrapallial fluid (group II), they were detected with 88.3 ± 11 μg/ml and 46.7 ± 39 μg/ml on average, respectively. For all three different assays the t-Student test presented significant differences between the mixture group and each one of the other groups ($p < 0.05$).

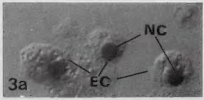
As represented in Figure 5, uronic acid measurements showed a significant ($p < 0.05$) lower value in the group where the extrapallial fluid (II) was used (25.0 ± 2.0 μg/ml) than in situations I and III. In the latter groups, I and III, values of uronic acids were close to each other with concentrations of 81.5 ± 2.7 μg/ml and 82.5 ± 3.8 μg/ml, respectively. Similar distributions were detected for hexosamines where the highest value of 118.4 ± 10 μg/ml was observed in the assay of group I, followed by the situations III and after II with 99.1 ± 26 μg/ml and 72.8 ± 7.0 μg/ml on average, respectively. So, in both uronic acids and hexosamines measurements, t-Student test yielded significant differences ($p < 0.05$) when compared to the situations where the extrapallial fluid medium (II) was used with the other (I) horse serum medium (I) and mixture medium (III) groups of assays.

The chitin estimation based on the difference of hexosamine and GAG concentrations was only possible in the groups I and II with similar concentration values of 30.1 and 26.1 μg/ml, respectively.

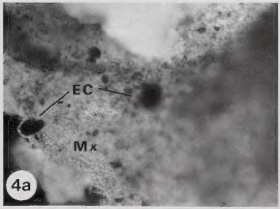
1

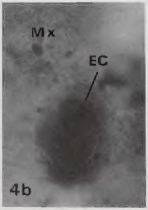

EC
Mv
2a


Mv
Sr
EC
2b


NC
EC
3a

EC
3b


EC
Mx
4a


Mx
EC
4b

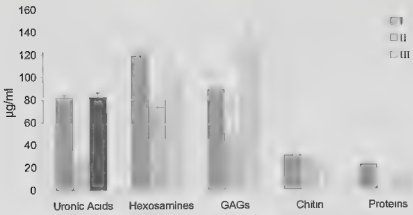


Figure 5. Different components measured in the matrix pellicle secreted *in vitro* during a five-eight day period by the OME cells of *Anodonta cygnea* Uronic acids, hexosamines, glycosaminoglicans (GAGs), chitin and proteins analysed in the matrix from distinct culture media: horse serum (I), extrapallial fluid (II), and horse serum and extrapallial fluid mixture (III). The numbers of samples per assays are showed between parentheses.

Total protein determination revealed that in the experiment with horse serum (I) the amount of proteins was significantly ($p < 0.05$) higher (21.5 ± 0.9 µg/ml) in contrast with a small amount (1.0 ± 0.2 µg/ml) in the assay with extrapallial fluid (II). In the case where both additives were present in the culture medium the value was significantly different ($p < 0.05$) with 13.0 ± 0.2 µg/ml.

DISCUSSION

It has been proposed that organic matrices can regulate the growth of the biomineral in a variety of ways: by initiation of crystal growth, determination of crystal polymorphism, control of crystal shape or termination of crystal growth (Wheeler *et al.*, 1988). The methodology, proposed here in order to approach the biomineralisation role of the organic matrix, is the *in vitro* experimentation with the mantle cells from molluscs based on the study of Poncet *et al.* (2000). For this reason preliminary studies of the culture of cells from extrapallial mantle epithelium of *Anodonta cygnea* are now being carried out with specific culture media.

Figures 1 and 2. Cells isolated from the outer mantle epithelium (OME) of *Anodonta cygnea* after hyaluronidase treatment at 1 4 mg/ml; 1) cells with columnar structure immediately after isolation; 2a and 2b) cells with round shape 15-20 minutes after isolation. Two different regions can be observed, one consisting in a plasma membrane with smooth surface, and another consisting in a dense array of filaments in the external face. EC – extrapallial cells; Mv – microvilli; Sr – smooth region (magnification × 625).

Figure 3. Hemacolor staining of cells from the OME of *Anodonta cygnea* After isolation cells maintain their viability. EC – extrapallial cells; NC – nucleus. (magnification × 625).

Figure 4A and B. Secreted matrix involving the OME cells A dense array of polymerised matrix in a five eight day culture can be visualised. EC extrapallial cells involved by matrix; Mx – secreted matrix (magnification × 625 and × 3125).

The present results showed morphological differences in two distinct regions of cells isolated from the OME of *A. cygnea*. This apparently heterogeneous aspect of OME cells corresponds to the apical and basal asymmetry of the cells when laid under a stratified epithelium. In fact, the OME cells *in loco* form a columnar epithelium with a set of microvilli at its apical face (Machado *et al.*, 1988a). Different dimensions of these cells can be explained by the difference in cell secretion stages and/or in intracellular compound contents since they are highly secretory cells. After being separated, these cells adopt an approximately spherical shape due to the new conditions of surface tension.

During the culture period, these cells revealed a good adherence to the plate surface and cellular activity by their high secretory capacity. This function is in accordance with the basic activity of these cells as was demonstrated by Kobayashi (1964) and Wilbur (1964) and further studies by Machado *et al.* (1988a) about the involvement of these cells in the secretion of the organic matrix to be incorporated in the shell structure. Two cell groups were identified in the external epithelium according to the results on the periodic acid Shiff reaction (Machado *et al.*, 1988a). One of the groups was found to secrete a neutral polysaccharide suggesting a structural mucopolysaccharide (MPS) resembling chitin (Machado *et al.*, 1991; 1994). More recent work by Moura *et al.* (2000a) described the existence and seasonal variations of proteins, proteoglycans (GASs), glucosamines and chitin in the extrapallial fluid of *A. cygnea*. The present results clearly indicate that primary OME cells, cultured *in vitro* with adapted media, maintain intrinsic and specific secretory proprieties concerning these components during a period of 5-8 days. This suggests that the observed cells seem to belong to the major cell group of OME that *in vivo* condition has a specific role in the shell matrix formation.

GAGs have been described as acidic molecules, thereby revealing high affinity for calcium ions with a crucial role in the process of biomineralisation through the nucleation of calcium carbonate crystals (Misogianes and Chasteen 1979, Grégoire 1972; Simkiss 1965). GASs assays demonstrated that the secreted material consisted of polymers comprising repeated disaccharide units associated with a protein core forming macromolecules like a proteoglycan structure. Actually, the present results showed the secretion of a polymerised matrix with a dense and consistent mass where GAGs and proteins were identified and measured with significant concentrations. Also the clear quantification of uronic acids and hexosamines with proportional amounts seems to confirm definitively the GAGs composition in these secreted material. In addition, since the GAG molecules consist of uronic acids and hexosamines in the molecular proportion of 1:1, it is commonly accepted that the additional amounts of hexosamines are attributed to the chitin composition for forming the shell (Brine and Austin, 1981; Kjellén and Lindahl, 1991). The chitin values here indicated were determined under this theoretical assumption. Interestingly, the content values obtained in this assay using the *in vitro* culture primary cells from the OME are in accordance with seasonal analysis reported for fluids in *A. cygnea* (Moura *et al.*, 2000a). This fact suggests similarities, at least in functional terms, between the cells maintained *in vitro* and those *in vivo*. Moreover, the results indicate the OME cell ability to be limited to the *in vitro* biomineralisation studies.

Considering the different composition in all groups I, II and III, it is possible to say that there was similar cell adherence and aggregation. Curiously, GAG, protein, uronic acid and hexosamine compounds occurred in significantly lowest concentrations in the cell group II

cultured in extrapallial fluid medium. On the other hand, the group III with mixture medium did not provide ideal conditions for chitin production as it does under an *in vivo* condition. GAGs secretion in the group III occurred in a high concentration, which seems to mean that the whole equivalent hexosamine produced in this medium was totally incorporated in the GAGs formation. Contrary to this, the group I (horse serum) seems to have the best conditions to promote the secretion of all the elements mentioned within the normal content according to the results of Moura *et al.* (2000a). In general, the yellow aspect of the secretion may due to the melanin production occurring normally during the shell periostracum formation (Wilbur 1964).

CONCLUSION

The primary cell cultures from the mantle of *A. cygnea,* where the proteoglycan/glycosaminoglican and chitin were synthesised, constitute a proof that an effective OME cell activity with *in vitro* culture conditions is possible. So, the results demonstrate that *in vitro* culture of this biological preparation, mainly with an artificial medium to which the horse serum was added, can be used in biomineralisation studies in order to understand the matrix arrangement and the calcium nucleation processes.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Prof. Russel Pinto for helping in the cytospins isolation techniques, Dr Fátima Carvalho for information on the basic principles and techniques *in vitro* culture systems and Dr. John Bulger for his assistance in editing the English text. This work was supported by JNICT grant (Junta Nacional de Investigação Científica e Tecnológica).

REFERENCES

Abolins-Krogis A. 1961.. The histochemistry of the mantle of *Helix pomatia* in relation to the repair of damaged shell. *Arkiv för Zoologi* (2)**15**: 461-473.

Brine C.J. & Austin P.R 1981. Chitin isolates: species variation in residual amino acids. *Comparative Biochemistry and Physiology* **70B**:173-178.

Coimbra J., Machado J., Fernandes P.L., Ferreira H.G. & Ferreira K.G.. 1988. Electrophysiology of the mantle of *Anodonta cygnea. Journal of Experimental Biology* **149**: 65-88.

Crenshaw M.A. 1972.. The soluble matrix from *Mercenaria mercenaria* shell. *Biomineralization* **6**: 6-11.

Davis J.M. 1994. Basic Cell Culture. *In*· A practical approach (D. Rickood & B.D. Hames eds) 57-89 Oxford University Press, New York.

Durming W.C., 1957. Repair of a defect in the snail *Helix aspersa Journal of Bone and Joint Surgery* **39A**: 377-393.

Fisher W.S. & Mewell R.I.E., 1986. Seasonal and environmental variation in the protein and carbohydrate levels in the hemolymph from American oysters (*Crassostrea virginica,* Gmelin). *Comparative Biochemistry and Physiology* **85A**: 365-372.

Gold E.W., 1979. A simple spectrophotometric method for estimating glycosaminoglycan concentrations. *Analytical Biochemistry* **99**: 183-188.

Grégoire C., 1972. The structure of the molluscan shell. *In*: Chemical Zoology Vol. 7 (M. Florkin & B.T. Scheer eds): 45-102. Academic Press, New York.

Greenfield E.M., Wilson D.C. & Crenshaw M.A., 1984. Ionotropic nucleation of calcium carbonate by molluscan matrix. *American Zoologist* **24:** 925-932.

Guardabassi A. & Piacenza K.L., 1958. Le manteau de l'escargot *Helix pomatia*. Étude cytologique et histochimique. *Archives d'Anatomie Microscopique et de Morphologie Expérimentale* **47**: 25 46.

Hudson R.L., 1992. Ion transport by the isolated mantle epithelium of the freshwater clam, *Unio complanatus*. *American Physiological Society. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **263**(1): R76-R83

Istin M. & Kirschner L.B., 1968. On the origin of the bioelectrical potential generated by freshwater clam mantle. *Journal of General Physiology* **51:** 478-496.

Kjellén L. & Lindahl U., 1991. Proteoglycans: structures and interactions. *Annual Review of Biochemistry* **60:** 443-475.

Kobayashi S., 1964. Studies on shell formation X. 1964. A study of the proteins of the extrapallial fluid in some molluscan species. *Biological Bulletin* **126:** 414-422.

Lowry O.H., Rosebrough N.I., Farrand A.L. & Randall R.J., 1951 Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* **193:** 263-275.

Machado J., Castilho F., Coimbra J., Monteiro E., Sá C., & Reis M., 1988a. Ultrastructural and cytochemical studies in the mantle of *Anodonta cygnea*. *Tissue and Cell* **20**(5): 797-807.

Machado J., Coimbra J., Sá C. & Cardoso I., 1988b Shell thickening in *Anodonta cygnea* by induced acidosis. *Comparative Biochemistry and Physiology* **91A**(4): 645-651.

Machado J., Ferreira K.G., Ferreira H.G & Fernandes P.L., 1990 The acid-base balance of the outer mantle epithelium of *Anodonta cygnea*. *Journal of Experimental Biology* **150:** 159-169.

Machado J., Reis M.L., Coimbra J. & Sá C., 1991. Studies on chitin and calcification in the inner layers of the shell of *Anodonta cygnea*. *Comparative Biochemistry and Physiology* **101B:** 413-418.

Machado J., Marvão R., Ferreira C., Moura G., Reis M.& Coimbra J., 1994. Study on mucopolysaccharides as a shell component of *Anodonta cygnea*. *Bulletin de l'Institut Océanographique*, Monaco **14**(1): 141 150

Marsh M.E. & Sass R.L., 1984. Phosphoprotein particles: calcium and inorganic phosphate binding structures. *Biochemistry* **23**: 1448-1456.

Misoguianes M.J & Chasteen N.D., 1979. Extrapallial fluid A chemical and spectral characterization of the extrapallial fluid of *Mytilus edulis*. *Analytical Biochemistry* **100**. 324-334.

Modrowski D. & Marie P.J., 1993. Cells isolated from the endosteleal bone surface of adult rats express differentiated osteoblastic characteristics *in vitro*. *Cell and Tissue Research* **271:** 453-460.

Moura G., Vilarinho L., Santos A.C & Machado J., 2000a. Organic compounds in the extrapallial fluid and haemolymph of *Anodonta cygnea* (L) with emphasis on the seasonal biomineralization process. *Comparative Biochemistry and Physiology* **125B**: 293 306.

Moura G., Vilarinho L., Guedes R. & Machado J., 2000b. The action of some heavy metals on the calcification process of *Anodonta cygnea* (Unionidae): nacre morphology and composition changes. *Hahotis* **29:** 43-53.

Mukai M., Yoshimine Y., Akamin A. & Maeda K., 1993. Bone like nodules formed *in vitro* by rat periodontal ligament cells. *Cell and Tissue Research* **271**: 453-460.

Neff J.M., 1972. Ultrastructure of the outer mantle epithelium of the clam *Mercenaria mercenaria* in relation to calcification of the shell. *Tissue and Cell* **4**: 591-600.

Pipe R.K., Farley S.R. & Coles J.A., 1997. The separation and characterisation of haemocytes from the mussel *Mytilus edulis*. *Cell and Tissue Research* **289**(3): 537 – 545.

Poncet J.M., Serpentini A., Thiébot B., Villers C., Bocquet J., Boucaud-Camou E. & Lebel J M., 2000. In vitro synthesis of proteoglycans and collagen in primary cultures of mantle cells from the nacreous mollusk, *Haliotis tuberculata*: a new model for study of molluscan extracellular matrix. *Marine Biotechnology* **2**: 387-398.

Russel-Pinto F., Reimão R. & de Sousa M., 1994. Haemocytes in *Cerastoderma edule* (Mollusca, Bivalvia): distinct cell types engage in different responses to sheep erythrocytes. *Fish and Shellfish Immunology* **4**: 383-397.

Schoeters G., Leppens H., Van Gorp U. & Van den Heuvel R., 1992. Haemopoietic long term bone marrow cultures from adult mice show osteogenic capacity *in vitro* on 3-dimensional collagen sponges. *Cell Proliferation* **25**: 587-603.

Simkiss K., 1965. The organic matrix of the oyster shell. *Comparative Biochemistry and Physiology* **16**: 427 435.

Swift M L. & Ahmed M., 1983. A study of glucose, Lowry-positive substances, and triacyl-glycerol levels in the hemolymph of *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Journal of Shellfish Research*. **3**: 45 50.

Tsuji T., 1960. Studies on the mechanism of shell and pearl formation in Mollusca. *Journal of the Faculty of Fisheries, prefectural University of Mie,* **5**: 1-70.

Weiner S. & Hood L., 1975. Soluble protein of the organic matrix of mollusc shells: a potential template for shell. *Science* **190**: 987 989.

Wheeler A P., George J.W. & Evans C.A., 1981. Control of calcium carbonate crystal nucleation and crystal growth by soluble matrix of oyster shell. *Science* **212**: 1397-1398.

Wheeler A.P., Rusenko K.W., Swift D.M. & Sikes C.S., 1988. Regulation of in vitro $CaCO_3$ crystallisation by fractions of oyster shell organic matrix. *Marine Biology* **98**: 71-80.

Wheeler A.P. & Sikes C.S., 1984. Regulation of carbonate calcification by organic matrix. *American Zoologist* **24**: 933-944

Wilbur K.M., 1964. Shell formation and regeneration. *In:* Physiology of Mollusca, Vol. I, (K.M. Wilbur & C.M. Yonge eds.): 243-282. Academic Press, New-York- London.

Wilbur K. M. & Manyak D.M. 1984. Biochemical aspects on Marine Biodeterioration. *In*: Proceedings on Marine Biodeterioration (J.D. Costlow & R. Tipper eds.): 30-37 Naval Institute Press, Bethesda.

Whiteman P.D., 1973. The quantitative measurements of alcian blue-glycosaminoglycans complexes. *Biochemistry Journal* **131**: 343-350.

Haliotis 33: 15-22 (2004) Société Française de Malacologie

Inventaire de végétaux sauvages consommés par l'escargot géant africain *Archachatina ventricosa* (Gould, 1850): préférences alimentaires

Atcho OTCHOUMOU[1], Konan N'DA[1], Henri DOSSO[2] et Daniel Kouadio KOUASSI[1]

ABSTRACT

Inventory of wild plants consumed by the edible African giant snail *Archachatina ventricosa* (Gould, 1850): dietary preferences.

An inventory of wild plants consumed by the edible giant snail *Archachatina ventricosa* (Gould, 1850) was carried out in the laboratory. The four plants the most appreciated were proposed by pair to the snails in a dietary preference experiment and their chemical component determined. *Archachatina ventricosa* consumes miscelaneous wild plants but prefers *Cecropia peltata* and *Laportea aestuans*.

RÉSUMÉ

Un inventaire de végétaux sauvages consommés par *Archachatina ventricosa* (Gould, 1850) a été réalisé au laboratoire. Les quatre végétaux les mieux appréciés ont été proposés aux escargots au cours d'une expérience de préférence alimentaire et leur composition chimique déterminée. *Archachatina ventricosa* consomme une gamme très variée de végétaux sauvages et son préférendum alimentaire est *Cecropia peltata* et *Laportea aestuans*.

INTRODUCTION

Le régime alimentaire d'un animal, du point de vue qualitatif et quantitatif est d'une grande importance en biologie, en écologie et en conservation d'écosystème. La plupart des gastéropodes pulmonés choisissent leur nourriture dans un large spectre de végétaux disponibles après une

1 Laboratoire de Biologie et Cytologie Animales (Unité de Formation et de Recherches en Sciences de la Nature), Université d'Abobo-Adjamé, 02 BP 801, Abidjan 02, Côte d'Ivoire.
Correspondance à adresser à: Dr OTCHOUMOU Atcho, 26 BP 623, Abidjan 26 <atcho@aviso.ci>
2 Centre de Recherches en Ecologie (CRE), Université d'Abobo Adjamé, 02 BP 801 Abidjan 02, Côte d'Ivoire

sélection rigoureuse. Cette sélection alimentaire réalisée par un végétarien a deux incidences:

- sur l'animal car conditionnant la qualité et la quantité de végétaux ingéré et par voie de conséquence la croissance et la physiologie de celui-ci,

sur le végétal entraînant une perturbation de son développement et de l'écosystème dans lequel il vit (Cates et Orians, 1975; Lubchenco, 1978; Nicotri, 1980).

Il a été montré qu'*Achatina achatina* (Linné, 1758) consommait les principaux fourrages verts cultivés et qu'elle préférait en particulier les feuilles de salade (*Lactuca sativa*), de choux (*Brassica oleracea*), de manioc (*Manihot esculentus*) et de taro (*Xanthosoma maffafa*) (Otchoumou *et al.*, 1989-1990). Certaines espèces d'Achatinidae notamment *Achatina fulica* (Bowdich) sont considérées dans les régions où elles ont été introduites comme une peste pour les cultures et la végétation (Craze et Mauremootoo, 2002; Raut et Barker, 2002). En raison du nombre limité de travaux sur les régimes alimentaires d'escargots géants africains et du fait de leur importance dans l'approche du fonctionnement des écosystèmes tropicaux, nous nous sommes proposé de faire un inventaire des espèces végétales non cultivées consommées par *Archachatina ventricosa* en forêt puis de rechercher les préférences alimentaires d' *Archachatina ventricosa* parmi les espèces végétales les mieux appréciées.

MATERIEL ET METHODES

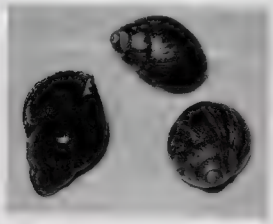
Origine des végétaux et des escargots utilisés

Les feuilles de 16 espèces végétales récoltées dans la forêt de l'Université d'Abobo Adjamé ont été utilisées dans ce travail. Cette forêt couvre une superficie de 5 ha environ. Elle fait partie de l'ensemble des forêts denses sempervirentes à forte pluviométrie (environ 2000 mm de pluie/an), température moyenne de 26°C et humidité relative de l'air d'environ 90%. Les espèces végétales caractéristiques sont les suivantes:

- pour la strate supérieure: *Carapa procera* (Meliaceae); *Mallotus oppositifolius* (Euphorbiaceae); *Hunteria eburnea* (Apocynaceae)

pour la strate moyenne: *Celtis spp.* (Ulmaceae); *Trichilia monadelpha* (Meliaceae); *Rauvolfia vomitoria* (Apocynaceae)

- pour la strate basse: *Palisota hirsuta* (Commelinaceae).



Une seule espèce d'escargot a été utilisée, *Archachatina ventricosa* (Gould, 1850) (figure 1). Tous les escargots ont été collectés dans les forêts denses du sud-ouest de la Côte d'Ivoire. Les expériences sont réalisées avec des juvéniles II (30 mm < longueur de coquille < 60 mm) et des reproducteurs (longueur de coquille > 60 mm).

Figure 1. L'escargot géant africain *Archachatina ventricosa* (Gould, 1850)

Méthodes

Pour réaliser l'inventaire alimentaire, 56 escargots dont 28 juvéniles II et 28 reproducteurs ont été sélectionnés après deux semaines d'acclimatation à la vie en captivité. Ils ont été répartis en 2 lots de deux 2 répétitions à raison de 14 escargots par bac et par classe d'âge, à la densité de 56 escargots/m^2 . Les bacs d'élevage en polystyrène de forme trapézoïdale à base carrée ont une hauteur de 0,125 m, une surface de base de 0,25 m^2 pour un volume estimé à 0,038 m^3 (figure 2). Ces bacs possèdent des couvercles de type moustiquaire en polystyrène constituant le dispositif anti-fuite. L'intérieur des bacs est recouvert d'une litière de 2 cm d'épaisseur de sable fin préalablement stérilisé par chauffage. Les escargots morts sont remplacés afin de maintenir les densités de départ. Après un jeûne de deux jours, l'aliment constitué de feuilles d'une espèce végétale, est proposé pendant cinq (5) jours aux escargots à raison de 200 g par lot. Un témoin constitué de la même quantité du végétal et placé dans les mêmes conditions expérimentales, permet de faire les corrections de poids dues à la dessiccation du matériel végétal. Pour la préférence alimentaire, les quatre (4) plantes les plus consommées pendant l'inventaire alimentaire sont retenues et proposées aux animaux par binômes à raison de 100 g par espèce végétale. Les animaux sont pesés au début et à la fin des cinq jours ainsi que les restes d'aliments au 1/100 de milligramme près. Quelques composants chimiques des quatre plantes utilisées dans l'expérience de préférence alimentaire ont été déterminés afin de mieux comprendre le préférendum des animaux.

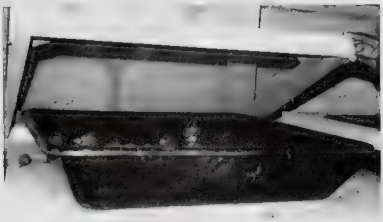


Figure 2. Enceinte d'élevage d'escargots

Expression des résultats

L'inventaire et la préférence alimentaire sont estimés à partir de la quantité de végétaux verts journellement consommés et du taux moyen journalier de consommation. Le choix d'un ou d'une combinaison de végétaux comme meilleur aliment tient compte non seulement de la quantité de végétaux verts journellement consommés mais aussi de l'indice de transformation qui est la quantité de végétaux nécessaire pour produire un kilogramme d'escargot.

*Quantité moyenne d'aliment vert journellement consommée (Q)

$Q(g/j) = (q_i - q_f)/t$ avec: q_i = quantité initiale de végétaux; q_f = quantité finale de végétaux; t = durée de la consommation en jour.

*Taux moyen journalier de consommation (TMJC)
TMJC (%) = (Qx100)/P avec Q = quantité moyenne d'aliment vert journellement consommée (g); P= Poids moyen de l'escargot (g)

*Rendement écologique de croissance (REC)
REC = (ΔPx100)/Q avec ΔP = gain de poids (g) pendant un intervalle de temps Δt; Q = quantité d'aliment frais consommée (g) pendant un intervalle de temps Δt

*Indice de transformation (IT)
IT = 100/REC

RÉSULTATS

Inventaire alimentaire

Les végétaux consommés expérimentalement par l'escargot: *Archachatina ventricosa* sont consignés dans le tableau 1. Toutes les 16 espèces végétales proposées aux juvéniles II ont été consommées tandis que chez les reproducteurs, *Combretum dolichopetalum* n'a pas été consommé. Dans l'ensemble, les quantités de végétaux ingérées par les juvéniles II sont de loin supérieures à celles des reproducteurs. Les quatre végétaux les mieux appréciés par ordre décroissant des quantités ingérées par les juvéniles II sont *Laportea aestuans, Cecropia peltata, Palisota hirsuta et Phaulopsis falcisepala* tandis que chez les reproducteurs, ce sont *Laportea aestuans, Cecropia peltata, Phaulopsis falcisepala* et *Palisota hirsuta.* Au regard de l'indice de transformation, les quatre végétaux pouvant constituer les meilleurs aliments et classés par ordre croissant des indices chez les juvéniles II sont *Phaulopsis falcisepala, Ficus mucuso, Cecropia peltata* et *Laportea aestuans* alors que chez les reproducteurs, ce sont *Ficus mucuso, Tabernaemontana crassa, Phaulopsis falcisepala* et *Cecropia peltata.*

Tableau 1: Inventaire de végétaux sauvages consommés par *Archachatina ventricosa.* IA = Ingestion alimentaire(g/j/g de poids vif), TMJC = Taux moyen journalier de consommation (%); REC = Rendement écologique de croissance (%); IT = Indice de transformation

	Juvéniles II				Reproducteurs			
Espèces végétales	IA(g/j)	TMJC(%)	REC(%)	IT	IA(g/j)	TMJC(%)	REC(%)	IT
Alchornea cordifolia (Euphorbiaceae)	0,0062	0,63	0	.	0,0012	0,12	0	
Canthium arnoldianum (Rubiaceae)	0,0353	3,53	0	.	0,0113	1,13	0	.
Cecropia peltata (Moraceae)	0,072	7,2	0,88	113,63	0,0159	1,6	1,86	53,76
Combretum dolichopetalum (Combretaceae)	0,0007	0,07	0	.	0	0	0	.
Ficus mucuso (Moraceae)	0,0154	1,54	1,01	99,00	0,0032	0,32	12,71	7,86
Laportea aestuans (Urticaceae)	0,0763	7,68	0,25	400	0,0365	3,65	1,41	70,92
Millettia zechiana (Papilionaceae)	0,023	2,3	0		0,0035	0,36	0	.
Palisota hirsuta (Commelinaceae)	0,0503	5,03	0	.	0,0116	1,12	0	.
Phaulopsis falcisepala (Acanthaceae)	0,0392	3,92	2,44	40,98	0,0126	1,26	2	50
Rauvolfia vomitona (Apocynaceae)	0,0327	3,27	0	.	0,0055	0,55	0	
Rhigiocarya racemifera (Menispermaceae)	0,0228	2,28	0	.	0,0055	0,55	0	
Sarcophrynium brachystachyum (Marantaceae)	0,0012	0,12	0	.	0,0001	0,01	0	
Sterculia tragacantha (Sterculiaceae)	0,0129	1,27	0	.	0,0105	1,05	0	
Tabernaemontana crassa (Apocynaceae)	0,006	0,6	0		0,0056	0,56	4,56	21,92
Trichilia monadelpha (Meliaceae)	0,0083	0,83	0	.	0,0025	0,25	0	
Costus afer (Zingiberaceae)	0,0087	0,87	0	.	0,0052	0,52	0	

Préférence alimentaire

Le tableau 2 donnent les résultats relatifs aux mélanges de plantes préférentiellement consommées par l'escargot *Archachatina ventricosa*. On remarque que ces animaux savent marquer leur préférence alimentaire. Celle-ci est exprimée par une consommation plus élevée de la plante préférée par rapport à l'autre plante du couple proposé.

Chez les juvéniles II, les feuilles de *Laportea aestuans* et *Cecropia peltata* prises individuellement sont préférées aux feuilles de *Palisota hirsuta* et de *Phaulopsis falcisepala*. Les feuilles de *Phaulopsis falcisepala* quant à elles sont préférées à celles de *Palisota hirsuta*. Le couple *Laportea aestuans/Palisota hirsuta* est le plus consommé (49.51 g) tandis que le moins consommé est le couple *Phaulopsis falcisepala/Laportea aestuans* (28.17 g) chez les juvéniles II.

Chez les reproducteurs, les feuilles de *Cecropia peltata* sont préférées à celles des trois autres espèces tandis que les feuilles de *Laportea aestuans* sont mieux appréciées que celles de *Palisota hirsuta* et de *Phaulopsis falasepala*. Le couple le mieux consommé chez les reproducteurs est *Laportea aestuans/Palisota hirsuta* alors que le moins consommé est *Cecropia peltata/Phaulopsis falasepala*.

Cependant, les animaux ont des préférences égales vis à vis de certaines plantes et couples de plantes. C'est le cas de *Cecropia peltata* et de *Laportea aestuans* chez les juvéniles II. C'est également le cas des couples *Palisota hirsuta/Cecropia peltata* et *Cecropia peltata/Laportea aestuans* chez les reproducteurs. L'indice de transformation montre que les couples *Cecropia peltata/Laportea aestuans* chez les juvéniles II et *Cecropia peltata/Phaulopsis falcisepala* chez les reproducteurs sont les meilleurs aliments (il faut respectivement 243,9 kg et 33,55 kg pour produire 1 kg d'escargot).

Tableau 2. Plantes préférentiellement consommées par *Archachatina ventricosa*. TMJC = Taux moyen journalier de consommation (%); REC = Rendement écologique de croissance (%), IT = Indice de transformation.

	Couples de végétaux	Consommation(g) Sous-total	Total	Proportion(%)	Niveau de préférence	TMJC (%)	REC	IT
Juvéniles II	*Palisota hirsuta/ Cecropia peltata*	10,55 31,29	41,84	25,25 47,78	*Cecropia peltata > Palisota hirsuta*	8,49	0,11	909,09
	Cecropia peltata/ Laportea aestuans	22,33 21,23	43,56	51,26 48,74	*Cecropia peltata = Laportea aestuans*	12,48	0,41	243,9
	Phaulopsis falcisepala/ Palisota hirsuta	31 76 5,62	37,38	84,97 15,03	*Phaulopsis falcisepala > Palisota hirsuta*	9,53	0,22	454,54
	Cecropia peltata/ Phaulopsis falcisepala	26,97 1,2	28,17	95,74 4,26	*Cecropia peltata > Phaulopsis falcisepala*	11,94	0	.
	Laportea aestuans/ Palisota hirsuta	40,43 9,08	49,51	81,66 18,34	*Laportea aestuans > Palisota hirsuta*	11,26	0	.
	Phaulopsis falcisepala/ Laportea aestuans	2,8 30,55	33,35	8,4 91,6	*Laportea aestuans > Phaulopsis falcisepala*	9 98	0	.
Reproducteurs	*Palisota hirsuta/ Cecropia peltata*	6 05 37,37	43,42	13,93 86,07	*Cecropia peltata > Palisota hirsuta*	1,38	0	.
	Cecropia peltata/ Laportea aestuans	21,21 23,1	44,31	47,87 52,13	*Cecropia peltata > Laportea aestuans*	1,36	1,7	58,82
	Phaulopsis falcisepala/ Palisota hirsuta	26,61 8,07	34,68	76,73 23,27	*Phaulopsis falcisepala > Palisota hirsuta*	1,08	0	.
	Cecropia peltata/ Phaulopsis falcisepala	23,48 5,01	28,49	82,41 17,59	*Cecropia peltata > Phaulopsis falcisepala*	0,81	2,98	33,55
	Laportea aestuans/ Palisota hirsuta	63,13 10,66	74,79	85,75 14,25	*Laportea aestuans > Palisota hirsuta*	1,97	1,15	86,95
	Phaulopsis falcisepala/ Laportea aestuans	1,44 54,21	55,65	2,59 97,41	*Laportea aestuans > Phaulopsis falcisepala*	1,45	0,81	123,45

Analyse chimique des espèces végétales les mieux consommées

Le tableau 3 indique la teneur en eau et la concentration de quelques éléments minéraux chez les quatre espèces végétales les mieux consommées par *Archachatina ventricosa*. Trois espèces végétales contiennent plus de 80% d'eau.

Tableau 3. Composition chimique (en %) des végétaux les mieux consommés par *Archachatina ventricosa*

Végétaux	Taux d'humidité	Cendre	Calcium	Potassium	Sodium
Cecropia peltata	83,5	1,63	0,14	0,13	0,014
Laportea aestuans	86,12	3,44	0,44	0,1	0,01
Palisota hirsuta	85,84	1,63	0,21	0,11	0,002
Phaulopsis falcisepala	77,27	4,9	0,74	0,19	0,003

DISCUSSION

Inventaire alimentaire

Les escargots sont essentiellement végétariens et recherchent particulièrement les plantes jeunes et tendres (Rousselet, 1979). L'escargot *Achatina achatina* se nourrit d'une gamme très variée de végétaux sauvages et cultivés (Hodasi, 1979). Des comportements similaires ont été observés par Gallois et Daguzan en 1986 chez *Helix aspersa* (Müller).

Presque tous les végétaux proposés aux escargots ont été consommés. Les résultats du présent inventaire en terme de quantité de végétaux consommés, sont en accord avec ceux de Upatham *et al.* (1988) chez *Achatina fulica* (Bowdich) et ceux de Otchoumou *et al.* (1989-1990) chez *Achatina achatina* (Linné) sur les fourrages verts.

La consommation d'un végétal semble liée à son apport nutritif. Les espèces végétales les mieux consommées (*Cecropia peltata, Laportea aestuans, Phaulopsis falasepala*) présentent les meilleures rendements écologiques de croissance. Les différences observées au niveau des quantités ingérées chez chaque catégorie d'escargot pourraient s'expliquer par des différences de texture, de parfum et même de la valeur nutriuve des feuilles des végétaux proposés, éléments qui concourent à une bonne consommation (Gallois et Daguzan, 1986). Par ailleurs, l'observation des feuilles de *Laportea aestuans* et *Phaulopsis falcisepala* montre la présence de poils sur les faces inférieure et supérieure. La grande consommation de ces végétaux serait due non seulement à l'existence de poils sur les feuilles mais aussi à la présence probable dans ces végétaux de substances attractives (Rao et Singh, 2000).

Préférences alimentaires

Deux composantes distinctes du préférendum alimentaire peuvent être reconnues (Nicotri, 1980):

l'une, relative à la sélection de végétaux susceptibles d'être consommés: c'est l'attraction,

- l'autre concerne le taux d'ingestion de cet aliment: c'est la comestibilité.

Comme le soulignent Watson et Norton (1985), la comestibilité reflète à la fois la vitesse avec laquelle un aliment donné satisfait les besoins physiologiques de l'herbivore et la facilité avec laquelle il peut être avalé et ingéré. L'attraction comprend plusieurs facteurs incluant la capacité de l'herbivore à détecter les odeurs des plantes et la caractéristique nutritive des plantes qui déterminent la valeur du végétal. Les taux moyens journaliers de consommation des juvéniles II pour les couples de végétaux présentés sont comparables à ceux obtenus par Otchoumou *et al.* (1989 1990) chez *Achatina achatina* (Linné). Les niveaux d'ingestion observés chez ces juvéniles II semblent dépendre de l'appétibilité du binôme. Ainsi, les binômes *Laportea aestuans/Palisota hirsuta* et *Cecropia peltata/Laportea aestuans* sont plus consommés que le binôme *Cecropia peltata/Phaulopsis falcisepala*. Les feuilles de *Cecropia peltata* , *Laportea aestuans* et de *Palisota hirsuta* seraient plus tendres que celles de *Phaulopsis falcisepala*. La composition chimique des plantes les mieux consommées révèle que la plupart d'entre elles contiennent plus de 80% d'eau (Otchoumou, 1989-1990). Dans son milieu naturel, l'escargot trouve la plus grande partie de l'eau nécessaire à son hydratation dans les fourrages verts qu'il consomme. L'analyse minérale des plantes indique un taux élevé en calcium chez *Phaulopsis falcisepala* et chez *Laportea aestuans*. Si le taux en calcium, potassium et sodium attestent de la qualité minérale de l'aliment pour l'escargot, il n'en demeure pas moins qu'ils restent insuffisants pour expliquer l'appétibilité des plantes et leurs apports à l'organisme de l'animal.

Quant aux raisons conditionnant le choix, il s'agit d'un ensemble de paramètres aux interrelations complexes. Ainsi, l'aptitude d'*Achatina fulica* (Bowdich) à mémoriser un aliment à long terme a été mis en évidence par Croll et Chase (1977). Les capacités de percevoir une odeur attractive et de remonter ses effluves jusqu'à l'origine chez les escargots sont mises en évidence par Farkas et Shorey (1976). Enfin, les stades physiologiques des individus et phénologiques des plantes jouent un grand rôle. Toutefois, le préférendum constaté n'implique pas qu'il corresponde à un meilleur aliment pour la croissance et la reproduction, ni que les plantes préférées soient ingérées en plus grande quantité.

CONCLUSION

Au terme de cette étude, il convient de retenir que:

- *Archachatina ventricosa* consomment expérimentalement une gamme variée de plantes sauvages et affectionnent les plantes riches en eau,

- le préférendum n'est pas de prime abord liée à la composition chimique des végétaux. Ainsi une plante préférée peut ne pas être riche en éléments minéraux. Cependant, les meilleurs aliments du point de vue de l'indice de transformation et de la composition chimique, sont les couples *Cecropia peltata/Phaulopsis falcisepala* et *Cecropia peltata/Laportea aestuan,*.

- dans le milieu naturel, *Archachatina ventricosa* consomme en grande quantité et donc détruit certaines plantes dont *Laportea aestuans* et *Cecropia peltata*. Cependant cette action ne peut pas constituer un véritable danger pour toute la flore d'une forêt mais, demeure un ennemi potentiel pour l'expansion de la biodiversité.

REMERCIEMENTS

Nous remercions très sincèrement le Professeur Laurent Ake-Assi du Laboratoire de Botanique de l'Unité de Formation et de Recherches Biosciences de l'Université de Cocody pour l'identification et la systématique des végétaux utilisés dans ce travail.

BIBLIOGRAPHIE

Cates R. G & Orians G. H. 1975 Successional status and the palatability of plants to generalized herbivores. *Ecology* **56**: 410-418.

Craze P.G & Mauremootoo J. R. 2002. A test of methods for estimating population size of the invasive land snail *Achatina fulica* in dense vegetation. *Journal of Applied Ecology* **39**(4): 653 660.

Croll R.P. & Chase R. 1977. A long term memory for food odors in the land snails *Achatina fulica*. *Behavioural Biology* **19**(2): 261-268.

Farkas S.R. & Shorey H.H. 1976. Anemotaxis and odourtrail following by the terrestrial snail, *Helix aspersa* Müller. *Animal Behaviour* **24**: 686-689.

Gallois L. & Daguzan J. 1989. Recherches écophysiologiques sur le régime alimentaire de l'escargot petit gris (*Helix aspersa*, Muller) (Mollusque Gastéropode Pulmoné Stylommatophore). *Haliotis* **19**: 77-86.

Hodasi J.K.M. 1979. Life history studies of *Achatina achatina* (Linné). *Journal of Molluscan Studies* **45**, 328 339.

Labchenco J 1978. Plant species diversity in a marine intertidal community: importance of herbivore food preference and algal competitive abilities. *American Naturalist* **112**: 23-39.

Nicotri M.E 1980. Factors involved in herbivore food preference. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **42**: 13-26.

Otchoumou A , Zongo, D. & Dosso, H. 1989 1990. Contribution à l'étude de l'escargot géant africain: *Achatina achatina* (Linné). *Annales d'Ecologie, Université Nationale de Côte d'Ivoire* **21**: 31-58.

Rao I.G. & Singh G.D K., 2000 Effect of single and binary combinations of plant-derived molluscicides on reproduction and survival of the snail *Achatina fulica*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **39**(4): 486-493.

Raut S.K. & Barker G M. 2002 *Achatina fulica* Bowdich and other Achatinidae as pests in tropical agriculture. pp 55-114, *in:* Barker G.M. (ed.)· Molluscs as crop pests. CABI Publishing, Wallingford, UK.

Rousselet M. 1979 L'élevage des escargots. Editions du Point Vétérinaire, Maisons Alfort, 122 p.

Upatham E.S., Kruatrachue M. & Baidikul V., 1988. Cultivation of the giant African snail: *Achatina achatina*. *Journal of the Science Society of Thailand* **14**: 25-40.

Watson D C. & Norton T.A , 1985. Dietary preferences of the common periwinkle, *Littorina littorea* L. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **88**: 193-211.

Utilisation d'un marqueur du stress général, *Stress on stress*, chez les Bivalves *Perna perna* (Linné 1758) et *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck 1819) pour l'évaluation de l'état de santé de la baie d'Agadir (Sud du Maroc)

Ali BANAOUI [1], Abdellatif MOUKRIM[1] et Abderazzak KAAYA [1]*

ABSTRACT

Use of a marker of global stress, stress on stress, in bivalves *Perna perna* and *Mytilus galloprovincialis* for the evaluation of pollution in Agadir bay (Southern Morocco).

The aim of this work is to validate the use of the stress on stress test as a general stress indicator on African mussel *Perna perna* and Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*, for the assessment of the health state of the Moroccan coasts. The test has been conducted firstly on molluscs sampled at three sites of the Agadir bay (*ex situ* test), then on the *in vivo* exposed molluscs to. i) water sampled in sites different by their pollution levels and ii) three kinds of pure pollutants (heavy metal, pesticide, hydrocarbon). The results indicate that the reduction of survival time among the tested molluscs is function of the pollution degree, both in the *ex situ* and *in vivo* tests. The TL50 is more reduced in mussels of the Anza polluted site (TL50 = 4,7 and 4,9 days at *P. perna* and *M. galloprovincialis*) compared to those of Cap Ghir (reference site) and Massa (respective TL50 were 9 and 8 days, for the two molluscs). The TL50 is also low in the animals exposed to the water sampled from the industrial zone of Anza and the Port sites, compared to their exposed to the water from reference site. Moreover, the molluscs exposed to the pure pollutants showed a distinctly decrease of TL50 (5-6 against 13,2 days for controls). The results obtained with stress on stress test in different experiments of this work are in accordance with those reported by the previous studies in Agadir bay, using biochemical indicators and chemical analysis. Therefore, this test could be integrated in monitoring programs for evaluation of health state of Moroccan coasts.

[1] Laboratoire *Eau et Environnement*, Université Ibn Zohr, Faculté des Sciences, BP 28/S, 80000, Agadir, Maroc. Fax + 212.48.220100. * auteur recevant la correspondance, Email: <moukrim@nomade.fr>.

RÉSUMÉ

L'objectif du présent travail est de valider l'utilisation du test *stress on stress* comme indicateur de stress général chez la moule africaine *Perna perna* et la moule méditerranéenne *Mytilus galloprovencalis*, pour l'évaluation de l'état de santé des côtes marocaines. Le test a été réalisé chez des moules prélevées de trois sites de la baie d'Agadir (*ex situ*) et chez des mollusques exposés *in vivo*, d'une part, à l'eau provenant de sites différents par leur degré de pollution (complexe portuaire, zone industrielle, plage municipale, etc.) et d'autre part, à trois types de polluants purs (un métal lourd, un pesticide et un hydrocarbure). Les résultats obtenus indiquent que la reduction du temps de survie chez les mollusques testés est fonction du degré de pollution, aussi bien pour les expériences *ex situ* qu'*in vivo*. En effet, le TL50 est plus réduit chez les moules prélevées du site qui reçoit les rejets industriels d'Anza (TL50 = 4,7 et 4,9 jours chez *P. perna* et *M. galloprovencalis*) que ceux du Cap Ghir (site loin de toute activité anthropique) et Massa (TL50 respectifs de 9 et 8 jours pour les deux mollusques). Le TL50 est également faible chez les animaux exposés à l'eau originaire d'Anza et du complexe portuaire par rapport à Cap Ghir. Quant aux individus exposés aux polluants purs, ils présentent un TL50 nettement plus faible (TL50 compris entre 5 et 6 chez *P. perna*) que celui des témoins (TL50 = 13,2 jours) Les résultats obtenus par le test *stress on stress* sont en parfaite concordance avec ceux rapportés par les travaux antérieurs, utilisant des indicateurs biochimiques chez ces mollusques et/ou des analyses chimiques des différents polluants dans le milieu Ceci plaide en faveur de l'intégration de ce test dans les programmes de biosurveillance des écosystèmes côtiers.

INTRODUCTION.

Actuellement, les moules (mollusques, bivalves) sont communément utilisées dans l'évaluation de la qualité de l'environnement. Ces organismes filtreurs, sédentaires, et ubiquistes sont capables d'accumuler une variété de polluants (métalliques et organiques) à des niveaux nettement supérieurs à ceux présents dans le milieu (Robert, 1976; Coombs, 1979; George, 1983; Geyer *et al.*, 1982). De ce fait, ces organismes sont largement utilisés comme espèces sentinelles dans les programmes internationaux de la biosurveillance du milieu marin (Goldberg *et al*, 1978; Cossa, 1989).

Si les analyses chimiques chez ces mollusques, permettent d'évaluer le niveau de polluants, le développement du concept de biomarqueur ces dernières décennies, permet de détecter les effets biologiques des contaminants, leur impact *in vivo* et/ou *in situ* sur les organismes et renseigne aussi sur la qualité de l'environnement dans leur milieu de vie. Ce concept se base sur la mesure de changements biochimiques et physiologiques induits par le changement des conditions du milieu, engendrant ainsi la réduction de la capacité des organismes à s'adapter aux variations environnementales (Lagadic *et al.*, 1997). Les biomarqueurs peuvent être de nature différente: biochimique, physiologique ou histologique (Narbonne *et al.*, 1991; Michel, 1993; Viarengo *et al*, 1985; Owen, 1972) Ces techniques sont fiables, spécifiques et permettent une mise en évidence précoce d'une éventuelle contamination (Garrigue, 1994). Cependant, elles renseignent généralement sur la toxicité d'une classe de polluants donnée. De plus, leur mise en place requiert souvent l'acquisition de certaines conditions permettant leur mesure; d'où l'intérêt de développer d'autres marqueurs dits de "stress général" ou encore "syndrome de stress", n'étant guère spécifiques mais permettent une évaluation globale de l'état de santé des organismes et de leur milieu de vie. Ainsi, ces marqueurs ont la particularité d'être simples, peu onéreux et fournissent des données relatives à la qualité de l'environnement du milieu, complémentaires à celles

obtenues par les autres biomarqueurs (Bayne, 1986; Shugart *et al.*, 1992; Viarengo et Canesi, 1991).

Le test *stress on stress* développé par Viarengo *et al.*, 1995 consiste alors à superposer au stress déjà subi par les animaux dans leur milieu (contamination *in situ*) ou d'une manière expérimentale au laboratoire (contamination *in vivo*), le stress causé par la mise en anoxie par exposition de ces organismes à l'air libre. En effet, les moules sont d'emblée capables d'endurer des émersions prolongées (plusieurs heures à plusieurs jours); cependant, la mortalité à l'air libre survient plus rapidement chez les individus pré-exposés à une contamination que leurs congénères sains.

Le présent travail qui se propose de développer ce test, s'inscrit dans le cadre d'un programme de recherche, mis en place par notre laboratoire, focalisé sur l'utilisation des moules comme espèces sentinelles, particulièrement la moule africaine *Perna perna*, et la validation des biomarqueurs de pollution pour l'évaluation de l'état de santé des côtes marocaines (Najimi *et al.*, 1997; Lagbouri, 1997; Kaaya *et al.*, 1999; Moukrim *et al.*, 2000; Kaaya, 2002, El Hamidi *et al.*, 2003).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

L'ensemble des expériences de la réponse au test *stress on stress*, a été réalisé comparativement chez les deux espèces de moules cohabitant sur les côtes marocaines: la moule africaine *Perna perna* et la moule méditerranéenne *Mytilus galloprovincialis*.

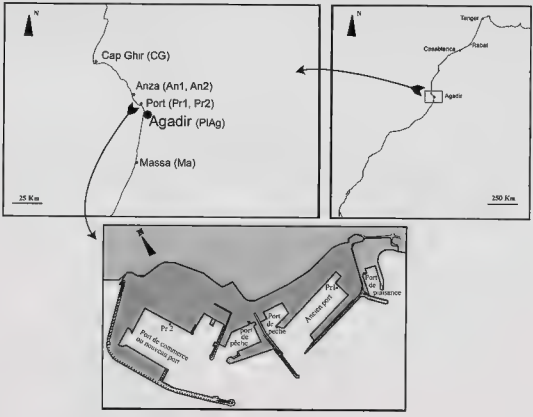


Figure 1. Sites de prélèvement des animaux et de l'eau utilisés dans l'expérience *Stress on stress*.

Trois types d'expériences ont été réalisés. Le premier a consisté en une application du test chez des mollusques prélevés dans trois sites représentatifs de la baie d'Agadir, dans l'objectif de comparer la qualité de l'environnement dans ces sites. Pour ce faire, 30 individus de chaque espèce d'une taille homogène (40 à 60 mm pour *P. perna* et 30 à 40 mm pour *M. galloprovincialis*) ont été récoltés à marée basse. Les trois sites considérés sont (figure 1): Cap Ghir (**CG**; site situé à 50 Km au nord d'Agadir, loin de toute source de pollution et considéré comme site de référence), Anza (**An**; localisé à 5 km au nord d'Agadir, comprend une zone industrielle et reçoit les rejets d'eau usées industrielles et domestiques et considéré comme site pollué) et Massa (**Ma**; région essentiellement agricole située à 30 Km au sud d'Agadir; le site de prélèvement est à proximité de l'estuaire de l'oued Massa qui traverse la région agricole). Ces animaux sont transportés dans des conditions isothermes dans de l'eau de mer jusqu'au laboratoire, où ont été immédiatement mis en anoxie dans des bacs à exposition.

Concernant le second type d'expériences, il a consisté en une utilisation du test *stress on stress* pour évaluer la qualité de l'environnement de plusieurs sites de la baie d'Agadir en exposant *in vivo* des moules originaires d'un site de référence, à l'eau prélevée dans ces sites. Ces derniers ont été choisis en fonction de leur degré de pollution: Cap Ghir (**CG**, loin de toute activité anthropique), Anza (**An1** localisé au niveau d'un rejet industriel et **An2** pris loin des rejets), Plage municipale d'Agadir (**PlAg**, plage touristique de la ville d'Agadir, très fréquentée durant toute l'année) et le complexe portuaire d'Agadir (**Pr1** et **Pr2**; considéré parmi les importants ports du Maroc).

Quant au troisième type d'expériences, le test a été appliqué pour évaluer l'impact d'une exposition à des polluants purs à travers la réponse des mollusques originaires d'un site de référence. Les trois polluants utilisés dans cette expérience représentent les principales familles des contaminants: le cadmium (métal lourd **Cd**) à une concentration de 100 µg/l, le malathion (pesticide organophosphoré **Mal**) à une dose de 500 µg/l et l'anthracène (hydrocarbure aromatique polycyclique HAP **Anth)** à raison de 6 mg/l.

Pour les deux dernières catégories d'expériences, les mollusques sont tous originaires du Cap Ghir. Après une période de stabulation pendant 48 h au laboratoire, les animaux sont exposés durant 96 h dans des bacs en plastique à raison de 30 individus par traitement, en plus d'un lot correspondant aux témoins. Ensuite, pour chaque traitement, les mollusques sont répartis en 3 lots de 10 moules et sont alors transférés en anoxie par remise à l'air libre. La mortalité est suivie jusqu'à épuisement total des animaux. Les critères pour la reconnaissance des individus morts sont principalement l'ouverture des valves et l'absence de l'activité musculaire.

L'ensemble des expériences d'exposition et la remise en anoxie est effectuée dans une salle climatisée (température varie entre 16 et 18°C).

Les résultats sont exprimés en taux de survie calculé chaque jour, selon la formule:

$$b = 100 - (a \times 100/X)$$ avec:

b: taux de survie (%)
a: nombre d'individus morts
X: nombre total d'individus

Le temps léthal correspondant à 50 % de mortalité (**TL50**) est ensuite déterminé.

RÉSULTATS

Application du test stress on stress sur des mollusques prélevés dans des sites de la baie d'Agadir, différents par leur degré de pollution

Les résultats du test *stress on stress* des animaux prélevés de Cap Ghir, Anza et Massa sont représentés dans les figures 2 (a) et (b), respectivement pour *P. perna* et *M. galloprovincialis*.

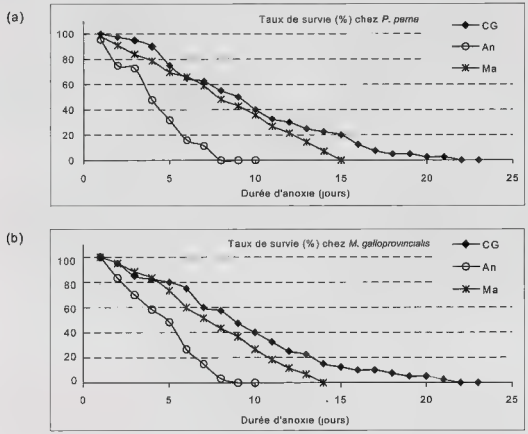


Figure 2. Evolution du temps de survie en anoxie (exprimé en %) des moules *Perna perna* (a) et *Mytilus galloprovincialis* (b) prélevées dans les sites de Cap Ghir (CG); Anza (An) et Massa (Ma).

Les figures montrent que pour les deux espèces, les animaux de Cap Ghir (CG) et ceux de Massa (Ma) présentent un profil de l'évolution du taux de survie comparable dans les deux sites. Quant au site d'Anza (An), le taux évolue rapidement pour atteindre un pourcentage de 100 % de mortalité au bout de 10 jours d'anoxie, alors que ce pourcentage est atteint au bout de 14-15 jours pour ceux de Ma et 20 jours pour les moules originaires de CG. Ceci est valable pour les deux espèces. Le temps léthal correspondant à 50 % de mortalité (**TL50**) est plus élevé dans le cas du site An (valeurs respectives pour *P. perna* et *M. galloprovincialis*: 4,7 et 4,9) que pour ceux de CG et Ma, où les valeurs sont de l'ordre de 8 et 9 jours pour les deux bivalves.

Ces résultats permettent de classer les trois sites en fonction de leur degré de pollution selon l'ordre suivant (du moins vers le plus pollué): Cap Ghir, Massa et Anza.

Application du test stress on stress en utilisant de l'eau de mer prélevée dans plusieurs sites de la baie d'Agadir, différents par leur degré de pollution.

Concernant la réponse au test *stress en stress* de *P. perna* et *M. galloprovincialis* exposés à l'eau de différents sites de la baie, les résultats sont donnés respectivement par les figures 3 (a) et (b).

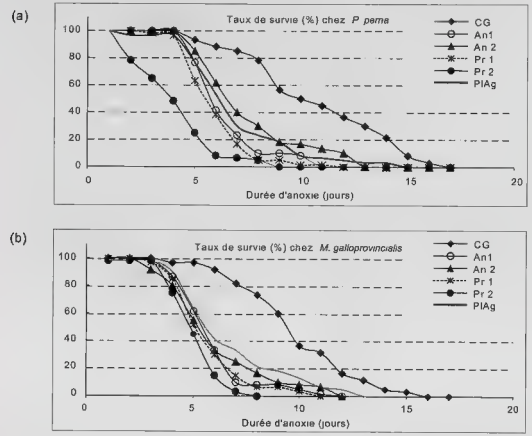


Figure 3. Effets de l'exposition à l'eau originaire de sites différents par leur degré de pollution, sur le temps de survie en anoxie chez *Perna perna* (a) et *Mytilus galloprovincialis* (b). Cap Ghir: CG; Zone industrielle d'Anza: An1 et An2, Complexe portuaire: Pr1 et Pr2b et Plage municipale d'Agadir: PlAg.

Les résultats montrent clairement l'effet de l'exposition à l'eau des sites du port (Pr1 et Pr2) et d'Anza (An1 et An2) par rapport au Cap Ghir (CG). Le taux de survie dans le cas des animaux exposés à l'eau de CG est nettement supérieur à celui des autres sites. En effet, 100% de mortalité n'est atteint pour CG qu'après 17 jours d'anoxie alors qu'il est de 9-13 jours pour les sites du port et d'Anza (Pr1, Pr2, An1 et An2). Dans le cas de la plage municipale, ce pourcentage est atteint à 15 jours. Concernant le TL50, le site Pr2 présente la plus faible valeur (4 et 4,8 jours respectivement pour *P. perna* et *M. galloprovincialis*) suivi dans l'ordre de Pr1, An 1, PlAg et An2 avec des TL50 compris entre 4 et 7 jours pour *P. perna*; alors que l'ordre des sites pour *M. galloprovincialis* est Pr1, An2, An1 et PlAg avec des TL50 de valeurs proches (compris entre 5 et 5,7 jours).

Application du test stress on stress pour évaluer la toxicité de polluants purs (un métal lourd, un pesticide et un hydrocarbure) sur les deux espèces de moules

Les résultats relatifs à la réponse des mollusques au test stress on stress après exposition à court terme aux polluants purs sont représentés respectivement pour *P. perna* et *M. galloprovincialis* dans les figures 4 (a) et (b).

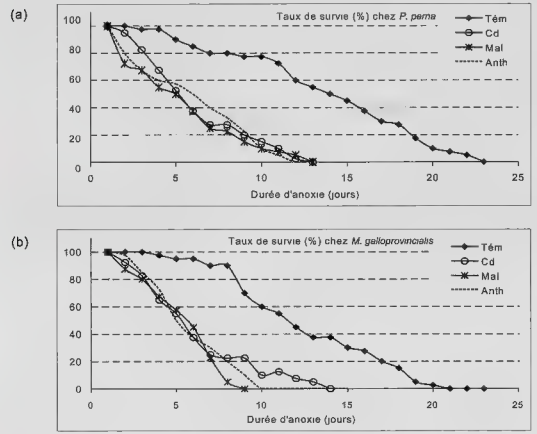


Figure 4. Effet de l'exposition aux polluants purs sur le temps de survie en anoxie chez *Perna perna* (a) et *Mytilus galloprovincialis* (b). Tém (témoin), Cd (cadmium, 100 µg/l), Mal (malathion, 500 µg/l) et Anth (anthracène, 6 mg/l).

D'après les résultats, il paraît clairement que chez les deux espèces, l'exposition aux trois types de polluants réduit considérablement le taux de survie des individus exposés, en comparaison avec les témoins. En effet, pour ces derniers, l'épuisement total des animaux est atteint au delà de 20 jours d'anoxie, alors que 100 % de mortalité survient au bout 10 à 13 jours pour les mollusques exposés. Chez les deux bivalves, le TL50 est presque confondu pour les trois polluants (5-6 jours). Cependant, le malathion et le cadmium semblent induire les mortalités plus rapidement chez la première espèce comparée à la deuxième qui semble être plus sensible à l'anthracène et au cadmium.

DISCUSSION

L'ensemble des résultats obtenus au terme de ce travail, montrent que le test *stress on stress* peut être utilisé comme marqueur de stress général pour l'évaluation de la qualité de l'environnement des écosystèmes aussi bien en utilisant des mollusques prélevés sur le terrain qu'à travers l'exposition d'animaux au laboratoire. En effet, la réduction du taux de survie (matérialisé par un faible TL50) est fonction du degré de pollution. Les faibles temps de survie observés chez les animaux originaires du site pollué (Anza) ou issus de l'exposition à l'eau provenant de sites pollués (port et Anza) ou aux polluants purs, n'est qu'une conséquence de l'effet de la contamination par les différents polluants appliqués ou ceux présents dans le milieu.

De ce fait, les animaux originaires du site pollué d'Anza et les mollusques exposés à l'eau du port (Pr1 et Pr2), présentent un temps de survie qui est beaucoup plus réduit comparé à celui des moules de Cap Ghir (site situé loin de toute activité anthropique). Le TL50 enregistré pour les animaux de ce site (An, TL50 = 4,7 et 4,9 jours pour *P. perna* et *M. galloprovincialis*) est proche de celui obtenus pour les animaux exposés *in vivo* à différents polluants purs (TL50 de 5 6 jours) ceci pourrait être expliqué par les niveaux de pollution dus aux rejets d'eaux usées de nature variée et sans traitement préalable, dans le milieu (Bari, 1994; Id Halla, 1997; Touyer, 1997; Moukrim, 2000; Kaaya, 2002). Ces rejets contiendraient divers contaminants (métaux, hydrocarbures…) qui seraient à l'origine de plusieurs perturbations physico-chimiques et biologiques. En effet, des travaux antérieurs réalisés sur les mêmes sites, ont rapportés une contamination notable par les HAP du sédiment et des moules originaires ou transplantées dans ces sites (Essett, 1997; El Hamidi, 2003).

Nos résultats sont en concordance avec ceux obtenus par Viarengo *et al.*, (1995), qui ont testé la réponse *stress on stress* sur *Mytilus spp* exposé pendant 3 jours au Cu, DMBA (HAP) et l'arochlor 1254 (PCB). Ces auteurs ont observé une réduction significative de la capacité de survie en anoxie des animaux exposés, et ont rapporté que l'effet dépend essentiellement de la dose du polluant appliquée. Cet effet est plus prononcé en cas de mélange de polluants. De plus, ces mêmes auteurs ont réalisé le test de stabilité membranaire lysosomale sur les mêmes échantillons. Ce test considéré comme le plus sensible des biomarqueurs de stress général a donné une réponse significative chez les exposés par rapport aux contrôles, confirmant ainsi les résultats obtenus avec le test *stress on stress*.

Nos résultats sont aussi confortés par l'ensemble des travaux réalisés sur la réponse de biomarqueurs de pollution chez les deux espèces de moules prélevées dans les mêmes sites de la baie (Anza, Cap Ghir et Massa) (Najimi, 1994; Najimi *et al.*, 1997; Lagbouri, 1997; Kaaya *et al.*, 1999; El Hamidi *et al*, 2002) et qui ont rapporté des réponses significativement différentes dans le site pollué par rapport à celui de référence. De plus, les expériences de transplantation « *caging* » de moules prélevées d'un site de référence, dans les sites d'Anza et le port ont abouts à des résultats similaires (Azdi, 1999; El Hamidi, 2003).

A l'issue de cette étude, nous pouvons déduire que la réponse au test *stress on stress* peut être utilisée comme outil pour l'évaluation de l'état général de santé des écosystèmes côtiers marocains. De plus, en raison de la simplicité de sa mise en œuvre, ce test s'avère être une méthode originale, d'une extrême facilité de mise en place dans la mesure où elle ne nécessite pas de moyens sophistiqués. Il pourrait être intégré en routine dans les programmes de

biosurveillance, en tant qu'outil d'évaluation de l'état global de la contamination des milieux. Par ailleurs, la moule africaine *Perna perna* s'avère un bon modèle pour son utilisation.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Azdi M., 1999 Etude de quatre biomarqueurs d'exposition chez la moule africaine *Perna perna* dans la baie d'Agadir variation saisonnière et réponse lors de transfert dans des sites pollués. Mémoire de DESA, Faculté des Sciences Agadir, 59 pages.

Bari H., 1994. Evaluation du taux de métaux lourds et de quelques paramètres physico chimiques dans les eaux usée de la ville d'Agadir. Mémoire de DEA, Université Ibn Zohr, Agadir, 20 p.

Bayne B L. 1986. Measuring the effects of polluuon at the cellular and organism level. *In:* The role of the oceans as a waste disposal option (G. Kullemberg, ed): 617-634. New York: Riedel Publishing Company.

Coombs T.L., 1979. Heavy metal pollutants in the aquatic environnemnt. *In:* Animals and environmental fitness, Vol 1 (R. Gilles, ed.): 283-302. Pergamon Press, Oxford.

Cossa D., 1989. A review of the use of *Mytilus* spp. as quantitative indicators of cadmium and mercury contamination in coastal waters. *Oceanologica Acta* **12**: 417-432.

El Hamudi F., 2003 Etude de *Donax trunculus* comme espèce sentunelle pour l'évaluation de l'état de santé des plages sableuses de la baie d'Agadir. Thèse de Doctorat National, Université Ibn Zohr, Agadir. 225 p.

El Hamudi F., Banaoui A., Azdi M., Kaaya A., Zekhnini A. & Moukrim A., 2002 Utilisation de la réponse de quatre biomarqueurs d'exposition chez les bivalves *Perna perna* et *Donax trunculus* pour l'évaluation de la pollution dans la baie d'Agadir (sud du Maroc). *Haliotis* **32**: 21-32.

Es-Sette B., 1997. Contribution à l'évaluation de l'état de contamination du littoral du grand Agadir par les hydrocarbures de pétrole (y compris la zone portuaire). *Mémoire de DEA.* Université Ibn Zohr. 23 p

Garrigue P., 1994 Les indicateurs biologiques de contamination de l'environnement. *Analusis Magazine*, 22 (1): 16-17 .

George S.G., 1983. Heavy metal detoxication in the mussel *Mytilus edulis* L. Composition of cadmium-containing kidney granules (tertiary lysosomes). *Comparative Biochemistry and Physiology* **76C**: 49 58.

Geyer H., Sheenan P., Kotzias D., Freitag D. & Korte F., 1982. Prediction of ecotoxycological bevaviour of chemicals: relationship between physicochemical properties and bioaccumulation of organic chemicals in the mussel *Mytilus edulis. Chemosphere* **11**: 1121-1134.

Goldberg E.D., Bowen V.T. & Farrington J.W., 1978. The Mussel Wach. *Environmental Conservation* **5**: 101-125.

Id Halla M., 1997. Etude de la biologie des moules *Perna perna* Linné (1758) et *Mytilus galloprovuncialis* Lamarck (1819) dans la baie d'Agadir. Thèse de 3ème cycle. Université Ibn Zohr, Agadir. 157 p.

Kaaya A. 2002. Contribution à l'évaluation de l'état de santé de la baie d'Agadir. Etude de la physico-chimie du milieu et de certains biomarqueurs chez *Mytilus galloprovinaalis* et *Perna perna* (stratégie de réserve, bioaccumulation métallique et enzymes de biotransformation). Thèse de Doctorat d'État. Université Ibn Zohr, Faculté des Sciences, Agadir. 485 p.

Kaaya A., Najimi S., Ribera D , Narbonne J F. & Moukrim A., 1999. Characterization of glutathione S-transferases (GST) activities in *Perna perna* and *Mytilus galloprovincialis* used as a biomarker of pollution in the Agadir marine bay (South of Morocco). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **62**(5): 623-629

Lagadic L., Caquet T. & Amiard J.C., 1997. Biomarqueurs en écotoxicologie· principes et définitions. *In:* Biomarqueurs en Ecotoxicologie: Aspects Fondamentaux. (Lagadic L., Caquet T., Amiard J.C. & Ramade F. , eds.): 1-9. Masson, Paris.

Lagbouri A., 1997. Etude de la biologie de *Donax trunculus* dans la baie d'Agadir et de sa réponse à la pollution à travers trois biomarqueurs (Acétylcholinestérase, peroxydation lipidique et Glutathion S-Transferases). Thèse de 3ème cycle, Université Ibn Zohr, Agadir: 170 p.

Michel X., 1993. Contribution à l'étude des interactions entre les contaminants chimiques organiques et les organismes marins: Bases moléculaires et application à la biosurveillance de l'environnement côtier. Thèse de Doctorat. Université de Bordeaux I, n° 993. 234 p.

Moukrim A., Kaaya A., Najimi S., Roméo M., Gnassia-Barelli M. et Narbonne J F. 2000. Assessment of the trace metal levels in two species of mussels from the Agadir Marine Bay, South of Morocco. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **65**(4): 478-485.

Najimi S., Bouhaimi A., Daubèze M., Zekhnini A., Pellerin J., Narbonne J.F. & Moukrim A., 1997. Use of acetylcholinesterase in *Perna perna* and *Mytilus galloprovincialis* as a biomarker of pollution in Agadir Marine Bay (South of Morocco) *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **58**: 901-908.

Najimi S. 1994. Contribution à l'étude de l'acétylcholinestérase de deux moules *Mytilus galloprovincialis* et *Perna perna* comme biomarqueurs de pollution dans la baie d'Agadir. Memoire de CEA, Université Ibn Zohr, Agadir, 48 p.

Narbonne J.F., Ribera D., Michel X., Raoux C., Garrigue P., Manaud J.L., Lemaire F., Roméo M., Salaun J.P. & Lafaurie M., 1991. Indicateurs biochimiques de contamination de l'environnement marin: étude comparative en mer Méditerranée. *Oceanis* **17**(3): 257-275 .

Owen A., 1972. Lysosomes, peroxisomes and bivalves. *Science Progress,* Oxford, **60**: 299-318

Robert D., 1976. Mussel and pollution. *In:* Marine mussels: their ecology and physiology (B.L Bayne, ed): 67-80. Cambridge University Press.

Shugart L.R., Mc Charty J.F. & Halbrook R.S. 1992. Biological markers of environmental and ecological contamination: an overview. *Risk Analysis* **12**: 353-360.

Touyer O., 1997. Eaux usées dans le grand Agadir: Impact sur l'environnement et épuration dans le système infiltration percolation de Ben-Sergao (Etude physico-chimique et parasitologique). Thèse de 3ème cycle, Université Ibn Zohr. Agadir. 183 p.

Viarengo A., 1985. Biochemical effects of trace metals. *Marine Pollution Bulletin* **16**, 153-158.

Viarengo A. & Canesi L. 1991. Mussels as biological indicators of pollution. *Aquaculture* **94**: 225-243.

Viarengo A., Canesi L., Pertica M., Mancinelli G., Accomando R., Smaal A.C. & Orenesu M, 1995. Stress on stress response: A simple monitoring tool in the assessment of a general stress syndrome in mussels. *Marine Environmental Research* **39**: 245-248.

Behavioural responses to a sugar and some amino acids by two planorbid snail species: *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), an intermediate host for *Schistosoma mansoni* and *Helisoma duryi* (Wetherby, 1879)

Signe Tram KENWORTHY[1] *and Henry MADSEN*[1]

ABSTRACT

Previous experiments have suggested various sugars, carboxylic acids and amino acids as attractants for incorporation in a third generation controlled release formulation in order to control populations of schistosome intermediate host snails. In the present laboratory experiments, the attractability of maltose and the amino acids proline, glutamic acid and aspartic acid was tested in diffusion olfactometers, on the planorbid snails *Biomphalaria glabrata* and *Helisoma duryi*. Both snail species were attracted by maltose and proline. Attractability of the compound varied with concentration.

RÉSUMÉ

Réponse comportementales à un sucre et à quelques acides aminés de deux espèces de gastéropodes planorbidés: *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), hôte intermédiaire de *Schistosoma mansoni*, et *Helisoma duryi* (Wetherby, 1879)

Des expériences préalables ont suggéré plusieurs sucres, acides carboxyliques et acides aminés comme des attractants qui pourraient être incorporés à une troisième génération de formulations à libération contrôlée, pour le contrôle des populations de gastropodes hôtes intermédiaires de schistosomes. Dans les expériences de laboratoire rapportées ici, le potentiel d'attraction de la maltose et des acides aminés proline, acide glutamique et acide aspartique, a été testée dans des olfactomètres a diffusion, sur des gastéropodes planorbidés *Biomphalaria glabrata* et *Helisoma duryi*. Les deux espèces de gasteropodes étaient attirées par la maltose et la proline. Le pouvoir d'attraction du composé dépend de la concentration

INTRODUCTION

Schistosomiasis is regarded as one of the most important tropical parasitic diseases since at any time some 200 million people are at risk of infection with approximately 20 million suffering from severe disease (WHO 2003). The main strategy of controlling the disease is through chemotherapy of infected individuals. Additionally, snail control by molluscicides has been advocated because this would produce considerable reduction of the host snails, and thus reduce

[1] Danish Bilharziasis Laboratory, Jaegersborg Allé 1D, 2920 Charlottenlund, Denmark

transmission of the disease. However, molluscicding obviously has its drawbacks such as destruction of non-target organisms and the chemical pollution of water bodies and consequently, numerous attempts have been made to prepare and apply these molluscicides as controlled release formulations or bait formulations (Pfister *et al.*, 1994). Incorporation of specific molluscicides inside attractant food pellets would allow populations of target snails to be controlled with minimal adverse effects on the environment.

The objective of this study was to identify sugars or amino acids that were effective as attractants to two species of pulmonate snails.

MATERIALS AND METHODS

The snails used in this experiment were laboratory bred planorbid freshwater snails of two species, *Biomphalaria glabrata* (albino strain, Puerto Rico) and *Helisoma duryi* (Florida, U S.A.).

The snails were at all times maintained in SSW (Standard Snail Water) (Madsen, 1987) at a temperature of 26 ± 1°C and a photoperiod of 12 h light and 12 h darkness. Every other day the medium was changed and adult and premature snails were fed blanched and dried lettuce with a supplement of trout food pellets (Madsen & Monrad, 1981). The amount given was approximately the quantity that would be consumed within a 48 h period. Only snails with shell diameters in the range of 5.0-7.0 mm were used in the experiments. Prior to experimentation the snails were deprived of food for 24 h to encourage foraging behaviour. Snails were not used in experiments more than twice a week.

The olfactometers used in the present experiment consisted of an elongated chamber measuring 8×4×1.8 cm (l×w×h) joined at each end to a square end chamber measuring 4×4×2 cm (l×w×h). The end chamber was designed to hold a 4×4 cm square of Whatman no. 1 filter paper.

The chemicals used as attractants in this study were monohydrated carbohydrate D-maltose (min 95% maltose with a maximum of 2% maltotriose and 0.6% glucose content) and three amino acids: L-proline, L-glutamic acid (monosodium salt 99-100%, 1.0 mol/mol) and L-aspartic acid (> 99%). The compounds were dissolved in SSW to give final concentrations of 5×10^{-7} M, 5×10^{-6} M, 5×10^{-5} M, 5×10^{-4} M, 5×10^{-3} M, 5×10^{-2} M, 5×10^{-1} M and 1 M.

During the experiments one chamber contained a piece of filter paper previously soaked in test substance for 5 min, while the opposite chamber contained a control piece of filter paper, soaked in SSW for 5 min. Treatment and control squares were alternated in successive olfactometers to counteract any possible directional bias from gradients in light intensity. One snail was placed in the centre (zone 0) of each chamber with its shell aperture facing away from the treatment square and the time was noted (t=0). The position of each snail was noted at 5 min intervals for 120 min.

The olfactometer chamber was defined as five compartments equal in size in order to register the movements of the snails. The snails were scored positive if they were on the test side (zone +1) or in the test chamber (zone +2) and negative if on the control side (zone -1) or in the control chamber (zone -2). If snails were located in the zone in the middle of the chamber (zone 0) they were scored 0. The time spent by the snails in each location was then calculated. The total

amount of time spent in the test area was calculated and compared to the amount of time spent in the control area.

For each snail, the time spent on the test side (zones +1 and +2) as a proportion of the total observed time was calculated and used as an indication of attraction. Similarly, for each snail the time spent in the test chamber (zone +2) as a proportion of the total observed time on the test side (*i.e.* zones +2 and +1) was calculated and used as an indication of arrestation.

If snails are assumed to move at random within the olfactometer area, the probability of a snail being observed in either compartment is 0.2. The attractability index indicates the probability of the snails to be on the positive side (*i.e.* zones +1 and +2), which is 0.4 assuming the snails move at random. Hence attraction would be indicated if the index is significantly greater than 0.4. Similarly, the arrestant index indicates the probability of the snails to be on the test square (zone +2) if assumed that they move at random on the positive side (*i.e.* zones +1 and +2), and arrestation would be indicated if the index is significantly greater than 0.5.

To determine any correlation between the concentration of the compound and the attractability or the arrestability a univariate ANOVA (Zar, 1984) was performed on angular transformed proportions. Tests for trends across concentrations were done using polynomial contrasts up to the 5th order. Levene's test was carried out prior to the analyses in order to test for homogeneity of the variances. *P*-values less than 0.05 were taken to indicate significant differences.

RESULTS

Figures 1 and 2 show attractability and arrestability at various concentrations of maltose and proline to *B. glabrata* and *H. duryi*, respectively. Figures 3 and 4 show attractability and arrestability at various concentrations of glutamic acid and aspartic acid on the same species.

Maltose was highly effective as an attractant as well as an arrestant to *B. glabrata* at all concentrations. Proline was effective as an attractant at intermediate concentrations, *i.e.* 5×10^{-4} to 5×10^{-2} M, and at the lowest concentration tested. The effectiveness of proline as an arrestant was significant at all concentrations. Glutamic acid was effective as an attractant for *B. glabrata* at the highest concentrations starting from 5×10^{-2} M, and it was significantly effective as an arrestant at all concentrations tested. Aspartic acid was effective as an arrestant at all concentrations tested, and it attracted *B. glabrata* at intermediate concentrations of 5×10^{-5} M and 5×10^{-4} M (results are not shown).

Helisoma duryi reacted slightly different to the compounds than did *B. glabrata*. It was significantly attracted to maltose but only at the two highest concentrations tested, *i.e.* 5×10^{-1} M and 1 M. Maltose was effective as an arrestant at all concentrations. Proline did not attract *H. duryi* but was significantly effective as an arrestant at all the concentrations tested, except 5×10^{-2} M. Glutamic acid was effective at attracting *H. duryi* at the lowest concentrations tested and aspartic acid was effective as an attractant at intermediate concentrations. Both compounds were highly effective as arrestants.

Only for maltose, attractability and arrestability increased with concentration. There was a significant linear term ($P < 0.001$, attractability and $P < 0.05$, arrestability for both snail species).

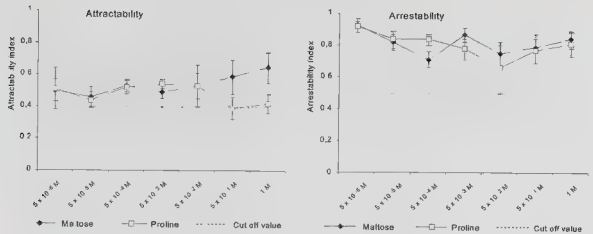


Figure 1. Attractability and arrestability of maltose and proline at different concentrations to *B. glabrata* as measured in diffusion olfactometers. Bars indicate ± 95% CL.

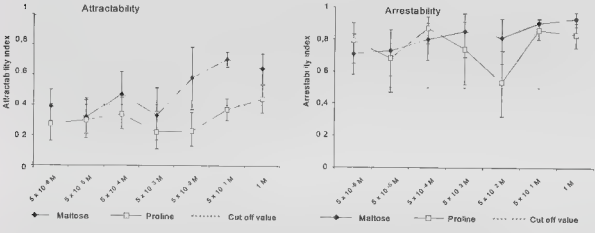


Figure 2 Attractability and arrestability of maltose and proline at different concentrations to *H. duryi* as measured in diffusion olfactometers. Bars indicate ± 95% CL.

DISCUSSION

The present results show that maltose may serve as an attractant and arrestant, even at a relatively low concentration. This corresponds well with the findings of Thomas (1986), who tested numerous sugars at various concentrations for their ability to attract *B. glabrata*. The properties of maltose as an attractant resemble those of short chain carboxylic acids (C_3-C_5) as described in earlier studies (Thomas *et al.*, 1983; Thomas *et al.*, 1989).

Helisoma duryi responded somewhat differently to the attractants than *Biomphalaria glabrata*. *H. duryi* was attracted to the two highest concentrations of maltose only and to a few of the amino acid solutions.

The differences in behavioural responses to the attractants between the snail species may reflect actual differences between the two species in the food-locating abilities, or they can be explained by differences in locomotive activity between the two species. According to Madsen

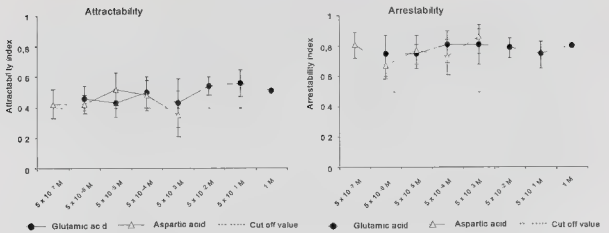


Figure 3. Attractability and arrestability of glutamic acid and aspartic acid at different concentrations to *B. glabrata* as measured in diffusion olfactometers. Bars indicate ± 95% CL.

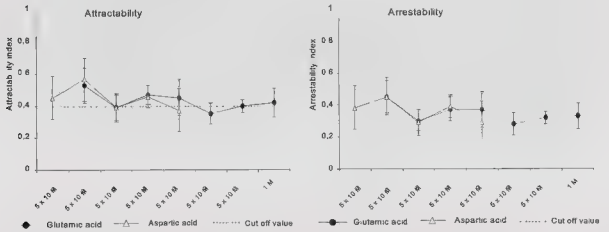


Figure 4. Attractability and arrestability of glutamic acid and aspartic acid at different concentrations to *H. duryi* as measured in diffusion olfactometers. Bars indicate ± 95% CL.

(1992) the choice of food of *H. duryi* is similar to that of *Biomphalaria*. It was found that the threshold values for the concentrations of the attractant food preparations were higher for *H. duryi* than was the case for *B. camerunensis* (Madsen, 1992). Furthermore, *H. duryi* proved slightly more active (*i.e.* moved faster) than the other species (Madsen, 1992).

One possible explanation for the high attractant and arrestant indices for maltose is that it is likely to be associated with decaying plant material which is an important food resource for planorbid snails (Thomas *et al.*, 1986). Starch, the main storage carbohydrate of plants, or its degradation product maltose, are likely to be the most abundant carbohydrates under these conditions, as free sugars, including sucrose, glucose and fructose, are rapidly utilized by micro decomposers (Patience *et al.*, 1983; Sterry *et al.*, 1985). As maltose and hydrolysed starch in solution are readily ingested by the snails (Thomas *et al.*, 1986) they could provide the snails with a valuable food source, as well as indicate the presence of readily ingestible detritus. Another

possibility is that the snails are attracted to maltose because they commonly encounter this sugar as it is released by epiphytic algae which form part of the module described by Thomas (1990).

In this study it was found that the amino acids, *i.e.* proline, glutamic acid and aspartic acid, were less efficient as attractants to the snails than was maltose. Proline was only effective as an attractant within a concentration range of 5×10^{-4} – 5×10^{-2} M, while the snails were attracted to aspartic acid solutions of concentrations in the range of 5×10^{-6} - 5×10^{-4} M. Glutamic acid attracted *B. glabrata* only at the highest concentrations of 5×10^{-2} M and more. In a study on juvenile *Biomphalaria glabrata* it was found that the snails were attracted to only 10 out of 44 amino acids tested. The snails either did not respond to or were repelled by the rest of the amino acids tested. Optimal concentrations of the amino acids were $4\text{-}5\times10^{-4}$ M (Thomas & Assefa, 1979). It is, however, generally concluded that proline, glutamic acid and aspartic acid are effective attractants and arrestants to both juvenile and adult *B. glabrata* at concentrations in the range of $4\text{-}5\times10^{-4}$ – $4\text{-}5\times10^{-2}$ M (Thomas & Assefa, 1979; Thomas *et al.*, 1980; Thomas *et al.*, 1989).

The differences in attractability between the amino acids might be dependent on the physiological situation of the animal. The reasons why some amino acids are ineffective as attractants or even act as repellents towards the snails (Thomas & Assefa, 1979; Thomas *et al.*, 1980; Thomas *et al.*, 1983; Thomas, 1986) in contrast to sugars and short-chain carboxylic acids (Thomas, 1986) require elucidation. The amino acid supply-demand balance for protein synthesis and metabolic processes is clearly a delicate one and, as pointed out by Carefoot (1982), could easily be disrupted by either qualitative or quantitative changes in the composition of the amino acid pool. In the case of amino acids the problem would be exacerbated by the heightened energy demands for deaminating the excess amino acids. This difficulty would not arise in the case of sugars and carboxylic acids (Thomas, 1986).

Conclusively, maltose is highly effective as an attractant to both snail species tested while proline was most effective of the amino acids as an attractant.

REFERENCES

Carefoot T.H., 1982. Phagostimulatory properties of various chemical compounds to sea hares (*Aplysia kurodai* and *A. dactylomela*). *Marine Biology*, **68**: 207-215.

Madsen H., 1987. Effect of calcium concentration on growth and egg laying of *Helisoma duryi*, *Biomphalaria alexandrina*, *B. camerunensis* and *Bulinus truncatus* (Gastropoda: Planorbidae). *Journal of Applied Ecology*, **24**: 823-836.

Madsen H., 1992. A comparative study on the food finding ability of *Helisoma duryi*, *Biomphalaria camerunensis* and *Bulinus truncatus* (Pulmonata: Planorbidae) *Journal of Applied Ecology*, **29**. 70 78.

Madsen, H. & Monrad, J. 1981. A method for laboratory maintenance of *Lymnaea natalensis* and for mass production of *Fasciola gigantica* metacercariae. *Journal of Parasitology*, **67**: 735-737.

Patience R.L., Sterry P.R. & Thomas J.D , 1983. Changes in chemical composition of a decomposing aquatic macrophyte, *Lemna paucicostata*. *Journal of Chemical Ecology*, **9**: 889-911.

Pfister G., El Naggar M. & Bahadir M., 1994 Evaluation of controlled release molluscicide formulations with improved environmental acceptance. *Chemosphere*, **28**: 305-312.

Sterry P.R., Thomas J.D. & Patience R.L., 1985. Changes in the concentration of short chain carboxylic acids and gases during decomposition of the aquatic macrophytes, *Lemna paucicostata* and *Ceratophyllum demersum*. *Freshwater Biology*, **15**: 139-153.

Thomas J.D., 1986. The chemical ecology of *Biomphalaria glabrata* (Say): sugars as attractants and arrestants. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **83A**: 457-460.

Thomas, J. D. 1990. Mutualistic interactions in freshwater modular systems with molluscan components. *In:* Advances in Ecological Research (M. Begon, A H. Fitter & A. McFodyen, eds.), **20**: 125-178. Academic Press.

Thomas J.D. & Assefa B , 1979. Behavioural responses to amino acids by juvenile *Biomphalaria glabrata*, a snail host of *Schistosoma mansoni*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **63C**: 99-108.

Thomas J.D., Assefa B, Cowley C. & Ofosu Barko J., 1980. Behavioural responses to amino acids and related compounds, including propionic acid, by adult *Biomphalaria glabrata* (Say), a snail host of *Schistosoma mansoni*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **66C**: 17-27.

Thomas J.D., Kowalczyk C. & Somasundaram B , 1989. The biochemical ecology of *Biomphalaria glabrata*, a snail host of *Schistosoma mansoni*. short chain carboxylic and amino acids as phagostimulants. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **93A**: 899-911.

Thomas, J. D., Ofosu-Barko J. & Patience L., 1983. Behavioural responses to carboxylic and amino acids by *Biomphalaria glabrata* (Say), the snail host of *Schistosoma mansoni* (Sambon), and other freshwater molluscs. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **75C**: 57-76.

Thomas J.D., Sterry P.R., Jones H., Gubala M & Grealy B.M., 1986 The chemical ecology of *Biomphalaria glabrata* (Say): sugars as phagostimulants. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **83A**: 461 475.

Zar J.H. 1984. Biostatistical Analysis. 2nd ed. Prentice-Hall International, Inc.

WHO 2003. <http://www.who.int/ctd/schisto/epidemio.htm>.

Behavioural responses of the snails *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) and *Helisoma duryi* (Wetherby, 1879) to attractants and molluscicides in a bait pellet

Signe Tram KENWORTHY[1] and Henry MADSEN[1]

ABSTRACT

Changes in the locomotion of snails when given access to food pellets containing an attractant (maltose or trout food) and a molluscicide (Bayluscide WP 70® or $CuSO_4$) was determined by measurements on snail tracks. Different pellet formulations were tested, both with and without a molluscicide, and it was concluded that the snails located the attractant containing pellets more effectively than the control pellets, and they elicited a klinotactic response. Trout food proved most effective as an attractant to the snails. The presence of $CuSO_4$ or niclosamide did not repel snails.

RÉSUMÉ

Réponses comportementales des gastéropodes *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) et *Helisoma duryi* (Wetherby, 1879) à des attractants et molluscicides en appâts granulés

Les altérations de la locomotion des gastéropodes auxquels sont présentés des appâts granulés contenant un attractant (maltose ou nourriture pour truites) et un molluscicide (Bayluscide WP 70® ou $CuSO_4$) ont été déterminées en mesurant les traces de déplacement. Des formulations différentes de granulés ont été testées, avec et sans molluscicide. Il est conclu que les gastéropodes localisent plus efficacement les granulés contenant des attractants que les granulés de contrôle, et que ceux ci déclenchent une réponse klinotactique. La nourriture por truites s'est avérée la plus efficace comme attractant pour les gastéropodes. La présence de $CuSO_4$ ou de niclosamide le les repousse pas.

INTRODUCTION

It is widely recognized that gastropods use olfaction as the principal modality for detection of long distance targets in their environment such as food sources and conspecifics (Thomas, 1982; Croll, 1983). With particular regard to feeding behaviour, numerous studies have shown that gastropods use chemical cues both to locate food and to discriminate between different food

[1] Danish Bilharziasis Laboratory, Jaegersborg Allé 1D, 2920 Charlottenlund, Denmark

items (Thomas, Ofosu-Barko & Patience, 1983; Masterson & Fried, 1992, Mancia & Fried, 1995; Shearer & Atkinson, 2001).

It has been suggested that the snail hosts of schistosomes could be removed selectively from transmission sites without harming non-target animals, by incorporating water soluble species specific attractants, arrestants, and feeding incitants into ingestible matrices containing a bound toxicant (Bousfield *et al.*, 1980; Abdel Hamid, 1997). An ideal pellet formulation would attract target snails and contain a phagostimulatory compound to encourage eating when contact is made by the snail.

The objective of this study was to identify any changes in locomotive behaviour of the snails, *Biomphalaria glabrata* and *Helisoma duryi* when they were given access to food pellets containing attractants and toxins compared to their behaviour towards non toxic pellets.

MATERIALS AND METHODS

Pre-treatment of snails

The snails used in this experiment were laboratory bred *Biomphalaria glabrata* and *Helisoma duryi*.

The snails were maintained in Standard Snail Water (SSW) (Madsen, 1987) at a temperature of 26 ± 1°C and a photoperiod of 12 h light and 12 h dark. Every other day the medium was changed and adult and premature snails were fed blanched and dried lettuce with a supplement of trout food pellets. The amount given was approximately the quantity that would be consumed within a 48 h period. Immature snails with a shell diameter of 5.0-9.0 mm (both species) were used in the experiments. It was concluded that since the species are on similar sexual developmental stage within the given shell diameter range, the sexual immaturity of the test snails would not influence the test results. Prior to experimentation the snails were deprived of food for 24 h to encourage foraging. Snails were not used in experiments more than twice a week. Snails that were tested on a molluscicide containing pellet were used only once.

Trout food

The trout food was manufactured by Dansk Ørredfoder A/S, Brande, Denmark. The contents are (minimum values): total protein 53%, digestible protein 48%, lipids 11%, carbohydrates 12%, and calcium 1.2%. The ash content does not exceed 13% and the energy content is 3,100 kJ per 100 g dry pellet (Madsen & Monrad, 1981).

Bait pellets

Bait pellets were prepared from a 100 ml 2% agar solution to which was added one of the following mixtures, giving six different test pellets:

20 g trout food

20 g trout food and 1 mg niclosamide

20 g trout food and 1 mg $CuSO_4$

1.8 g maltose

1.8 g maltose and 1 mg niclosamide

1.8 g maltose and 1 mg $CuSO_4$

Pellets made from 2% agar solution were used as controls. In order to dissolve the agar satisfactorily, the mixture was heated to approximately 50°C. The preparation was spread to uniform thickness on a glass plate, and after cooling, cut out in squares (5×5 mm). The pellets were dried at 60° C for 18 h. The average dry weight ±SD of pellets was 85.5 ± 5.0 mg (N=20) for pellets containing trout food (both with and without molluscicide) and 73.2 ± 4.0 mg (N=20) for maltose containing pellets.

Analysis of snail track

Experiments were conducted in clear plastic containers measuring 22×30×6 cm (w×l×h) with 1 Litre of SSW. One pellet was placed in the centre of the container, and immediately thereafter one snail was placed at a distance of 10 cm from the pellet with its shell aperture facing away from the pellet. The snail was allowed to move until its first contact with the pellet, and the time taken for it to achieve this was noted. The snail was then removed. Snails that failed to make contact with the pellet within 60 min were removed.

Water was decanted and the slime tracks made visible by adding a suspension of active charcoal. After rinsing and drying, the snail tracks were analysed:

Total length of the track
Length of the track in each of the following circular zones from the centre:
"zone 3" within 3 cm from the centre of the container (r = 3 cm),
"zone 2" within 3 cm from zone 3 (r = 6 cm), and
"zone 1" within 3 cm from zone 2 (r = 9 cm)
Number of entries into zones 1, 2, and 3
Number of changes in direction of movement in zone 3

For each experiment one pellet was given to one snail at $t = 0$ and the experiment was set up with five pellets of each type in each replica giving a total of 35 snails and pellets. The experiment was repeated four times giving at total of 20 replicates for each pellet type.

Statistical analysis

To determine any differences in travel speed and track lengths between the groups, a One-way ANOVA (Zar, 1984) was performed on logarithmically transformed values. To determine any differences in the proportional length of track (*i.e.* the track length within a given zone as a proportion of the total track length) within the three zones a univariate ANOVA was performed on angular transformed values (Zar, 1984). A priori contrasts were defined such that the control pellet was first compared to the two pellets with attractant and the second contrast then compared the two pellets with or without molluscicide. In order to test for homogeneity of the variances, Levene's test was carried.

The ability of snails to locate the pellet within the time limit was analysed using logistic regression analysis. Attractant (control, maltose or trout food) was first entered, then molluscicide (none, Bayluscide or $CuSO_4$) was entered and finally the interaction between the two was entered. Model fit was checked using the Hosmer Lemeshow statistic (Hosmer & Lemeshow, 1989). *P*-values less than 0.05 were taken to indicate significant differences.

RESULTS

Analysis of snail tracks

Logistic regression showed that the presence of trout food in the pellets significantly increased the location by *B. glabrata* ($P < 0.001$), while maltose had no effect (Fig. 1). *H. duryi* was significantly more likely to locate pellets containing an attractant ($P < 0.001$) than the control pellets and trout food was more attractive than maltose ($P < 0.05$).

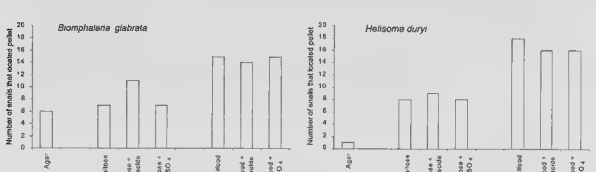


Figure 1. The number of *B. glabrata* and *H. duryi* that located the pellet within 60 min (N=5×4 snails)

The average speed of movement (*i.e.* total track length divided by time) of *B. glabrata* ranged from 0.03 to 0.06 cm s^{-1} (Fig. 2). There were no differences between groups. *H. duryi* moved significantly faster when given pellets containing trout food than when given control pellets ($P < 0.01$). Between groups the average speed of movement ranged from 0.03 to 0.05 cm s^{-1}. The presence of a molluscicide did not influence the speed of movement significantly, which was true for both snail species.

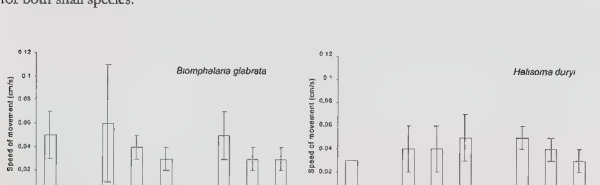


Figure 2. The average speed of movement (cm s^{-1}) for *B. glabrata* and *H. duryi* until contact made with the pellet. Only for the snails that made contact with the pellets. Bars indicate ± 95% CL. Since only one *H. duryi* in the "agar" group made contact with the pellet within the time limit, bars indicating ± 95% CL are missing in this group.

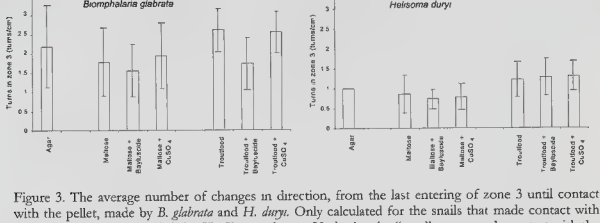


Figure 3. The average number of changes in direction, from the last entering of zone 3 until contact with the pellet, made by *B. glabrata* and *H. duryi*. Only calculated for the snails that made contact with the pellets. Bars indicate ± 95% CL. Since only one *H. duryi* in the "agar" group made contact with the pellet within the time limit, bars indicating ± 95% CL are missing in this group.

Figure 3 shows the average number of changes in the direction of movements or turns (for the last part of the track only, *i.e.* from the last entry into zone 3 until contact with the pellet). The frequency of changes in direction as the pellet was approached varied greatly among the snails. Generally, the snails moved in a zigzagging manner when approaching the pellet, but between the groups there were no significant differences in frequency of turning.

Many of the snails that failed to locate the pellet actually entered zone 3 (*i.e.* less than 3 cm from the pellet) and some snails which located the pellet did not do so at the first entry to this zone (results are not shown). *B. glabrata* and *H. duryi* entered the various zones more or less at the same frequency. The average number of entries into the zones (*i.e.* only when moving towards the pellet) varied moderately between the groups. The differences in frequency were not statistically significant.

DISCUSSION

It is clear that maltose and trout food act as attractants and that trout food is the most effective attractant of the two tested. This corresponds well with the findings of Madsen (1992) who tested the ability of three species of planorbid snails, *Helisoma duryi*, *Biomphalaria camerunensis* and *Bulinus truncatus* to locate a food source. The pellets containing trout food most likely release a variety of chemicals to the surrounding water, some at high concentrations. Specific chemicals known to attract planorbid snails include various amino acids (Uhazy, Tanaka & MacInnis, 1978; Thomas & Assefa, 1979; Thomas, Assefa, Cowley & Ofosu-Barko, 1980), short chain (C_2-C_5) carboxylic acids such as propanoic and butanoic acids (Thomas *et al.*, 1983; Daldorph & Thomas, 1988; Thomas, Kowalczyk & Somasundarum, 1989), hydrophilic and lipophilic extracts of either leaf lettuce or Tetramin (Masterson & Fried, 1992; Mancia & Fried, 1995), and various sugars, especially mono and disaccharides of which mannose, arabinose, cellobiose, maltose, maltotriose and glucuronic acid have been shown to be highly efficient (Thomas *et al.*, 1983; Thomas, 1986; Thomas *et al.*, 1986; Kpikpi & Thomas, 1992; Kpikpi & Thomas, 1993).

In the present study maltose did not prove as effective as an attractant similar as did trout food though it was more efficient as an attractant than agar. These findings correspond well with a study by Masterson & Fried (1992) who found that *B. glabrata* was attracted by both Tetramin, hen's yolk and leaf lettuce but preferred Tetramin.

One possible explanation for the relatively high attractant index for maltose is that it is likely to be associated with decaying plant material, which is an important food resource for detritivorous snails (Thomas, 1986; Thomas *et al.*, 1986). Starch, the main storage carbohydrate of plants, or its degradation product maltose, are likely to be the most abundant carbohydrates under these conditions, as free sugars, including sucrose, glucose and fructose, are rapidly utilized by microdecomposers (Patience, Sterry & Thomas, 1983; Sterry, Thomas & Patience, 1985; Thomas, 1986).

The finding that a significantly higher percentage of snails than would be expected by chance located the pellets indicates that the snails reacted to the attractants either with directional (taxis) or non directional, random movements (kinesis). Implicit in the theoretical framework of orientation mechanisms dealing with non-directional responses is that all turns are made randomly (Fraenkel & Gunn, 1961). The characteristic zigzagging shown by nearly all of the snails in this study that located the pellets resembles closely the classic examples of klinotaxis described by Fraenkel & Gunn (1961), and corresponds well with the theory that the snails are comparing chemical intensity at successive symmetrically placed points in space.

In this study no evidence of any repellent effect of the molluscicides towards the snails was found. The pellets containing a molluscicide and trout food were located just as frequently as the pellets containing only trout food, the same was true for maltose. Usually snails are to some extent repelled by copper, which is one of the disadvantages of using copper as a molluscicide (Etges & Gilbertson, 1966), and similar problems may arise when using niclosamide as a molluscicide (Jurberg *et al*, 1995). However, it is plausible that the effects of the attractants exceed the repellent effects of the molluscicides. Hence the snails are attracted by the pellets despite the contamination by molluscicides.

Conclusively, the pellets containing trout food were superior to the pellets containing maltose in attracting the snails and the presence of a molluscicide in the pellets did not influence the attractability of the pellets. The pellets proved to be effectively attractive to the snails.

REFERENCES

Abdel El Hamid A.Z., 1997. Development of bait formulations for control of intermediate hosts of African schistosome species. *Journal of Applied Toxicology* **17**: 391-395.

Bousfield J.D., Gomm J., McCapra F & Thomas J.D., 1980. The molecular characteristics of chemoreception in the snail *Biomphalaria glabrata* (Say). *Journal of Applied Ecology* **17**: 631-639.

Croll R.P., 1983. Gastropod chemoreception. *Biological Review*, 58: 293-319

Daldorph P.W.G. & Thomas J.D., 1988. The chemical ecology of some British freshwater gastropod molluscs: behavioural responses to short chain carboxylic acids and maltose. *Freshwater Biology* **19**: 167 178.

Etges F.J. & Gilbertson D.E., 1966. Repellent action of some chemical molluscicides on schistosome vector snails. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **15**: 618-624.

Fraenkel G.S. & Gunn D.L., 1961. The orientation of Animals. Kineses, taxes and compass reactions. Dover Publications, Inc.

Hosmer D.W. & Lemeshow S., 1989. Applied logistic regression. John Wiley and Sons, New York.

Jurberg P., Sarquis O., A dos Santos J.A. & da Conceicão Reis Ferreira R. (1995). Effect of niclosamide (Bayluscide WP 70®), *Anacardium occidentale* hexane extract and *Euphorbia splendens* latex on behaviour of *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), under laboratory conditions. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **90**: 191-194.

Kpikpi J.E.K. & Thomas J.D., 1992. A study of the sugar chemoreception niches of two bulinid snail hosts of schistosomiasis. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* **86**: 181-189.

Kpikpi J.E. & Thomas J.D., 1993. The sugar chemoreception niches of *Bulinus (Physopsis) globosus* (Morelet) and *Bulinus rohlfsi* (Clessin), the two most important snail hosts of *Schistosoma haematobium* (Bilharz) in West Africa. *Comparative Biochemistry and Physiology* **106A**: 373-379.

Madsen H., 1987. Effect of calcium concentration on growth and egg laying of *Helisoma duryi*, *Biomphalaria alexandrina*, *B. camerunensis* and *Bulinus truncatus* (Gastropoda: Planorbidae). *Journal of Applied Ecology* **24**: 823-836.

Madsen H., 1992. A comparative study on the food-finding ability of *Helisoma duryi*, *Biomphalaria camerunensis* and *Bulinus truncatus* (Pulmonata: Planorbidae). *Journal of Applied Ecology* **29**: 70-78.

Madsen H. & Monrad J., 1981. A method for laboratory maintenance of *Lymnaea natalensis* and for mass production of *Fasciola gigantica* metacercariae. *Journal of Parasitology* **67**: 735-737.

Mancia M.R. & Fried B., 1995. Chemoattraction and dietary preferences of *Helisoma trivolvis* (Gastropoda: Planorbidae) for leaf lettuce and tetramin. *The Veliger* **38**: 73-75.

Masterson C. & Fried B., 1992. Chemoattraction and dietary preferences of *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda: Planorbidae) for leaf lettuce, tetramin and hen's egg yolk. *Comparative Biochemistry and Physiology* **103A**: 597-599.

Patience R.L., Sterry P.R. & Thomas J.D., 1983. Changes in chemical composition of a decomposing aquatic macrophyte, *Lemna paucicostata*. *Journal of Chemical Ecology* **9**: 889-911.

Shearer A. & Atkinson J.W. 2001. Comparative analysis of food-finding behaviour of a herbivorous and a carnivorous land snail. *Invertebrate Biology* **120**: 199-205.

Sterry P.R., Thomas J.D. & Patience R.L., 1985. Changes in the concentration of short-chain carboxylic acids and gases during decomposition of the aquatic macrophytes, *Lemna paucicostata* and *Ceratophyllum demersum*. *Freshwater Biology* **15**: 139-153.

Thomas J.D., 1982. Chemical ecology of the snail hosts of schistosomiasis: snail-snail and snail-plant interactions. *Malacologia* **33**: 81-91.

Thomas J.D., 1986. The chemical ecology of *Biomphalaria glabrata* (Say): sugars as attractants and arrestants. *Comparative Biochemistry and Physiology* **83A**: 457-460.

Thomas J.D. & Assefa B., 1979. Behavioural responses to amino acids by juvenile *Biomphalaria glabrata*, a snail host of *Schistosoma mansoni*. *Comparative Biochemistry and Physiology* **63C**: 99-108.

Thomas J.D., Assefa B, Cowley C. & Ofosu-Barko J., 1980. Behavioural responses to amino acids and related compounds, including propionic acid, by adult *Biomphalaria glabrata* (Say), a snail host of *Schistosoma mansoni*. *Comparative Biochemistry and Physiology* **66C**: 17-27.

Thomas J.D., Kowalczyk C. & Somasundaram B., 1989. The biochemical ecology of *Biomphalaria glabrata*, a snail host of *Schistosoma mansoni*: short chain carboxylic and amino acids as phagostimulants. *Comparative Biochemistry and Physiology* **93A**: 899-911.

Thomas J.D., Ofosu-Barko J. & Patience L., 1983. Behavioural responses to carboxylic and amino acids by *Biomphalaria glabrata* (Say), the snail host of *Schistosoma mansoni* (Sambon), and other freshwater molluscs. *Comparative Biochemistry and Physiology* **75C**: 57-76.

Thomas J.D., Sterry P.R., Jones H., Gubala M & Grealy B.M., 1986. The chemical ecology of *Biomphalaria glabrata* (Say): sugars as phagostimulants. *Comparative Biochemistry and Physiology* **83A**: 461-475.

Uhazy L.S., Tanaka R.D. & MacInnis A.J., 1978. *Schistosoma mansoni*: Identification of chemicals that attract or trap its snail vector, *Biomphalaria glabrata*. *Science* **201**: 924-926.

Zar J.H., 1984. Biostatistical Analysis. 2nd ed. Prentice-Hall International, Inc.

BIBL. DU MUSEUM PARIS

Normes diverses

Les noms de taxa devront être cités et utilisés conformément au Code International de Nomenclature Zoologique (édition de 2000). Les noms génériques ou spécifiques seront écrits en *italique*, les noms de familles ou de divisions d'un rang plus élevé, en caractères normaux. Un nom spécifique, générique ou familial apparaissant pour le première fois dans le texte devra être accompagné de son auteur et date de publication. Auteur et date d'un taxon seront toutefois omis dans le titre de l'article. On évitera les tournures de phrases donnant lieu à confusion entre une référence bibliographique et l'auteur et date d'un taxon.

La bibliographie comprendra toutes les références citées dans le texte, et uniquement celles-ci. Toutefois, les références citées uniquement en tant qu'auteur et date d'un taxon ne sont pas obligatoirement incluses dans la bibliographie. Les titres des périodiques doivent apparaître *in extenso*. Les références seront citées selon un des modèles suivants:

Bourguignat J.R., 1857. Aménités malacologiques. *Revue et Magasin de Zoologie* (2)**9**: 3-31, pl. 1-4.

Swofford D.L. & Olsen G.J., 1990. Phylogeny reconstruction. *In:* Molecular systematics. (D.M. Hillis & C. Morris, eds.): 411-501. Sinauer Associates, Sunderland, Massachussets.

Dans le texte, on citera les références sous la forme "... selon Hall (1986)... ", "(Hall et Smith, 1986)", (Richardson *et al.*, 1985)...". Pour plusieurs articles d'un même auteur et d'une même date, on utilisera la forme "1985a, 1985b..."

Les tirés-à-part devront être commandés au moment des épreuves. Pour chaque article, 25 tirés-à-part gratuits seront envoyés aux auteurs. Des tirés-à-part supplémentaires, payants, pourront être commandés au même moment.

Comité de rédaction

Patrick ARNAUD	Station Marine d'Endoume, Rue de la Batterie des Lions, F-13007 Marseille
Alan BEBBINGTON	3 Crawley Lane, Uley, Nr Dursley, Glos GL11 5 BJ, Grande-Bretagne
Alain BODOY	IFREMER, Rue de l'Ile d'Yeu,B.P. 1049 - F-44037 Nantes cedex 01
Serge GOFAS	Departamento de Biología Animal, Facultad de Ciencias Universidad de Málaga, E-29071 Málaga, Espagne
Marcel LE PENNEC	Institut Universitaire Européen de la Mer, F-29280 Plouzané
Mathieu POULICEK	Laboratoire d'Ecologie marine, Institut de Zoologie, Université de Liège, 22 Quai van Beneden, B - 4020 Liège, BELGIQUE
Jean TARDY	51, rue Emile Racaud, F-17000 La Rochelle
Nardo VICENTE	C.E.R.A.M., Faculté des Sciences et Techniques, de Saint Jérôme, F-13397 Marseille cedex 13

Directeur de la publication: Georges RICHARD, Président de la S.F.M.
Éditeur de ce volume: Serge GOFAS

Société Française de Malacologie - siège : 55, rue Buffon, F-75005 Paris ISSN: 0397.765 X
Imprimé en Espagne par Imagraf, Málaga - Achevé d'imprimer le

Sommaire

J. MONTEIRO, I. RIBEIRO, I. SOARES da SILVA, L. BALDAIA & J. MACHADO
In vitro synthesis of organic matrix in primary culture cells from the outer mantle epithelium of *Anodonta cygnea* (Unionidae) 3

A. OTCHOUMOU, K. N'DA, H. DOSSO & D.K. KOUASSI
Inventaire de végétaux sauvages consommés par l'escargot géant africain *Archachatina ventricosa* (Gould, 1850): préférences alimentaires 15

A. BANAOUI, A. MOUKRIM & A. KAAYA
Utilisation d'un marqueur du stress général, *Stress on stress*, chez les Bivalves *Perna perna* (Linné, 1758) et *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) pour l'évaluation de l'état de santé de la baie d'Agadir (Sud du Maroc) 23

S.T. KENWORTHY & H. MADSEN
Behavioural responses to a sugar and some amino acids by two planorbid snail species: *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), an intermediate host for *Schistosoma mansoni* and *Helisoma duryi* (Wetherby, 1879) 33

S.T. KENWORTHY & H. MADSEN
Behavioural responses of the snails *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) and *Helisoma duryi* (Wetherby, 1879) to attractants and molluscicides in a bait pellet 41